



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 659**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05020550 .9**

(96) Fecha de presentación : **25.09.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1650307**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

(54) Título: **Procedimientos de fabricación de proteínas recombinantes utilizando inhibidores de la apoptosis.**

(30) Prioridad: **27.09.1999 US 156232 P**

(73) Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2010

(72) Inventor/es: **Van de Goor, Jana;**
Hamilton, Robert W. y
Dixit, Vishva

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2010

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 346 659 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de fabricación de proteínas recombinantes utilizando inhibidores de la apoptosis.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la mejora en los procedimientos de fabricación de proteínas recombinantes utilizando uno o más inhibidores de la apoptosis.

10 Antecedentes de la invención

Se cree que el control del número de células en los mamíferos viene determinado, en parte, por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Una forma de muerte celular, en ocasiones denominada muerte celular necrótica, se caracteriza normalmente por ser una forma patológica de muerte celular producida como resultado de algún tipo de trauma o de lesión celular. Por otra parte, existe otra forma, la forma "fisiológica" de muerte celular, que suele producirse de una manera ordenada o controlada. Esta forma ordenada o controlada de muerte celular se denomina, a menudo, "apoptosis" [ver, por ejemplo, Barr *et al.*, *BioTechnology*, 12:487-493 (1994); Steller *et al.*, *Science*, 267:1445-1449 (1995)]. La muerte celular apoptótica se produce de manera natural en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y la selección clonal en el sistema inmunológico [Itoh *et al.*, *Cell*, 66:233-243 (1991)].

El control del número de células en un cultivo celular y en los biorreactores también es un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Existen datos en la literatura que indican que la muerte celular que se produce en los biorreactores puede ser un proceso apoptótico [Suzuki E., *et al.*, *Cytotechnology*, 23:55-59 (1997); Al-Rubeai, M. y Singh R.P. *Curr. Opin. Biotech.*, 9:152-156 (1998)]. Se ha descrito que el proceso apoptótico puede estar inducido por una deficiencia de nutrientes [Franek F. y Chládkova-Srámková K. *Cytotechnology*, 18:113-117 (1995); Mercille S. y Massie B., *Biotechnol. Bioeng.*, 44:1140-1154 (1994); Singh R.F., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 44:720-726 (1994)], deficiencia sérica [Singh R.P., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 44:720-726 (1994); Zanghi A., *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 64:108-119 (1999)] o por otros parámetros controlables del cultivo celular en biorreactores, aunque no se trata de un proceso totalmente controlado debido a la mecánica de los biorreactores, a una falta de total comprensión de los parámetros necesarios para el cultivo, o por otras causas indeterminadas.

Tal como se entiende actualmente, el programa de la apoptosis o muerte celular contiene, al menos, tres elementos importantes: los activadores, los inhibidores y los efectores; en *C. elegans*, estos elementos están codificados, respectivamente, por tres genes, *Ced-4*, *Ced-9* y *Ced-3* [Steller, *Science*, 267:1445 (1995); Chinnaiany *et al.*, *Science*, 275:1122-1126 (1997); Wang *et al.*, *Cell*, 90:1-20 (1997)]. Dos de los miembros de la familia de TNFR, TNFR1 y Fas/Apol (CD95), pueden activar la muerte celular apoptótica [Chinnaiany y Dixit, *Current Biology*, 6:555-562 (1996); Fraser y Evan, *Cell*, 85:781-784 (1996)]. TNFR1 también es conocido por mediar la activación del factor de transcripción, NF-KB [Tartaglia *et al.*, *Cell*, 74:845-853 (1993); Hsu *et al.*, *Cell*, 84:299-308 (1996)]. Además de cierta homología ECD, estos dos receptores comparten homología en su dominio intracelular (ICD) en una interfase de oligomerización conocida como el dominio de muerte [Tartaglia *et al.*, *supra*; Nagata, *Cell*, 88:355 (1997)]. Los dominios de muerte también se encuentran en diversas proteínas de metazoos que regulan la apoptosis, a saber, la proteína Drosophila, Reaper, y las proteínas de mamíferos denominadas FADD/MORT1, TRADD, y RIP [Cleaveland y Ihle, *Cell*, 81:479-482 (1995)].

Durante la unión del ligando y la agregación del receptor, se cree que TNFR1 y CD95 reclutan la proteína FADD para que entre a formar parte de un complejo de señalización inductor de la muerte. Supuestamente, CD95 se une directamente a FADD, mientras que TNFR1 se une a FADD indirectamente a través de TRADD [Chinnaiany *et al.*, *Cell*, 81:505-512 (1995); Boldin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:387-391 (1995); Hsu *et al.*, *supra*; Chinnaiany *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:4961-4965 (1996)]. Se ha descrito que FADD actúa como una proteína adaptadora que recluta la proteasa relacionada con Ced3, MACH-alfa/FLICE (caspasa 8), para que entre a formar parte de un complejo de señalización de muerte [Boldin *et al.*, *Cell*, 85:803-815 (1996); Muzio *et al.*, *Cell*, 85:817-827 (1996)]. MACH-alfa/FLICE parece ser el desencadenante que activa una cascada de proteasas apoptóticas, incluyendo la enzima conversora de interleucina-1beta (ICE) y la CPP32/Yama, que pueden ejecutar algunos aspectos críticos del programa de muerte celular [Fraser y Evan, *supra*].

Recientemente se ha revelado que la muerte celular programada implica la actividad de miembros de una familia de proteasas de cisteína relacionadas con el gen de muerte celular de *C. elegans*, *Ced-3*, y con la enzima conversora de IL-1 de mamífero, ICE. La actividad de las proteasas ICE y CPP32/Yama puede inhibirse por el producto del gen del virus de vaccinia, *crmA* [Ray *et al.*, *Cell*, 69:597-604 (1992); Tewari *et al.*, *Cell*, 81:801-809 (1995)]. Estudios recientes muestran que CrmA puede inhibir la muerte celular inducida por TNFR1 y CD95 [Enari *et al.*, *Nature*, 375:78-81 (1995); Tewari *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:3255-3260 (1995)].

Como se muestra en la revisión recientemente realizada por Tewari *et al.*, TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de citoquinas proinflamatorias y coestimuladoras, de receptores de citoquinas, y de moléculas de adhesión celular mediante la activación del factor de transcripción, NF-KB [Tewari *et al.*, *Curr. Op. Genet. Develop.*, 6:39-44 (1996)]. NF-KB es el prototipo de una familia de factores de transcripción diméricos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas [Verma *et al.*, *Genes Develop.*, 9:2723-2735 (1996); Baldwin, *Ann. Rev. Immunol.*, 14:649-

681 (1996)]. En su forma latente, NF-KB forma un complejo con miembros de la familia de inhibidores de IKB; durante la inactivación de la IKB como respuesta a determinados estímulos, el NF-KB liberado se transloca al núcleo, en donde se une a secuencias específicas de ADN y activa la transcripción del gen.

5 Para revisiones recientes de dichas rutas de señalización, ver, por ejemplo, Ashkenazi *et al.*, *Science*, 281:1305-1308 (1998); Nagata, *Cell*, 88:355-365 (1997).

Hasta la fecha se han publicado informes conflictivos en lo referente a los efectos de los inhibidores de caspasas y a la expresión de genes anti-apoptóticos en células recombinantes cultivadas. Por ejemplo, Murray *et al.*, *Biotech Bioeng.*, 51:298-304 (1996) describen que la sobreexpresión de *bcl-2* en células de mieloma NSO no afecta a la fase de decadencia característica de las células cultivadas. Otras investigaciones han encontrado, por el contrario, que *bcl-2* puede ser efectivo en la prevención de la muerte de algunas líneas celulares bajo condiciones de cultivo celular [ver, por ejemplo, Itoh *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 48:118-122 (1995); Mastrangelo *et al.*, *TIBTECH*, 16:88-95 (1998); Simpson *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 54:1-16 (1997); Singh *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 52:166-175 (1996)].
10 Goswami *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 62:632-640 (1999) publican que han observado que el inhibidor de caspasa, z-VAD-fmk, no es capaz de ampliar de forma significativa la vida de un cultivo libre de suero de células CHO. WO 98 35986A describe un procedimiento para fabricar una proteína recombinante (receptor TRAIL) utilizando un inhibidor de caspasa, z-VAD-fmk, en células huésped CV-1/EBNA.
15

20 Descripción de la invención

La presente invención se basa en los descubrimientos de los Solicitantes que, utilizando uno o más inhibidores de la apoptosis en cultivos de células recombinantes y en la producción de proteínas, pueden reducir de forma significativa la apoptosis en el cultivo celular y mejorar las técnicas de producción de proteínas recombinantes. Los procedimientos revelados en la presente aplicación son útiles, por ejemplo, en la prolongación de la viabilidad de las células de los cultivos celulares o en la mejora o aumento del rendimiento de la producción de proteínas recombinantes a partir de los cultivos celulares. Mejoras adicionales proporcionadas por la invención se describen en detalle más adelante.

La invención describe un procedimiento para la fabricación de proteínas recombinantes utilizando uno o más inhibidores de la apoptosis. El procedimiento incluye las etapas de (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína de interés, (b) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína de interés, (c) provisión de una célula huésped, (d) transformación o transfección de la célula huésped con los vectores referidos en las etapas (a) y (b), (e) provisión de los medios de cultivo celular, (f) cultivo de la célula o células huésped transformadas o transfectadas en un medio de cultivo celular bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés y el inhibidor de la apoptosis, y (g) recuperación o purificación de la proteína de interés de las células huésped y/o del medio de cultivo celular. Opcionalmente, el procedimiento también incluye la etapa de mezclar un inhibidor adicional de la apoptosis al medio de cultivo. En el procedimiento, los genes que codifican, respectivamente, el inhibidor de la apoptosis y la proteína de interés se pueden insertar en un vector único (por ejemplo, co-transfектados en un vector único) o, de forma alternativa, se pueden insertar en dos vectores separados. Preferiblemente, los genes que codifican, respectivamente, el inhibidor de la apoptosis y la proteína de interés se insertan en dos vectores separados, presentando cada vector un tipo de marcador de selección diferente al del otro vector. Opcionalmente, el procedimiento provee la expresión transitoria de la proteína de interés y la expresión estable o transitoria del inhibidor de la apoptosis. Opcionalmente, el gen que codifica el inhibidor de apoptosis comprende un gen que codifica la proteína caspasa-9-DN o baculovirus p35.

45 En otro ejemplo, el procedimiento incluye las etapas de (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína de interés, (b) provisión de una célula huésped que comprende ADN que codifica un inhibidor de la apoptosis, (c) transformación o transfección de la célula o células huésped con el vector referido en la etapa (a), (d) provisión de los medios de cultivo celular, (e) cultivo de la célula o células huésped transformadas o transfectadas en el medio de cultivo celular bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés y el inhibidor de la apoptosis, y (f) recuperación o purificación de la proteína de interés de las células huésped y/o del medio de cultivo celular. Opcionalmente, el gen que codifica el inhibidor de la apoptosis se puede integrar de manera estable en el genoma de la célula huésped. Opcionalmente, el procedimiento incluye la etapa adicional de mezclar una molécula adicional inhibidora de la apoptosis en el medio de cultivo. Opcionalmente, el procedimiento proporciona la expresión transitoria de la proteína de interés y la expresión estable o transitoria del inhibidor de la apoptosis.

La presente invención proporciona un procedimiento de fabricación de proteínas recombinantes que utiliza uno o más inhibidores de apoptosis, cuyo procedimiento incluye las etapas de (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína de interés, (b) provisión de una célula huésped, (c) transformación o transfección de la célula huésped con el vector referido en la etapa (a), (d) provisión de los medios de cultivo celular, (e) provisión de un inhibidor de apoptosis, (f) mezcla del inhibidor de apoptosis en el medio de cultivo, (g) cultivo de la célula o células huésped en el medio de cultivo celular bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés, y opcionalmente (h) la recuperación o purificación de la proteína de interés de las células huésped y/o del medio de cultivo celular tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el procedimiento proporciona la expresión transitoria de la proteína de interés.

En otro ejemplo descrito aquí, el método incluye las etapas de (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica un inhibidor de la apoptosis, (b) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína

de interés, (c) provisión de una célula huésped, (d) transformación o transfección de la célula huésped con los vectores referidos en las etapas (a) y (b), (e) provisión de los medios de cultivo celular, (f) cultivo de la célula o células huésped transformadas o transfectadas en el medio de cultivo bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés y el inhibidor de la apoptosis, y (g) congelación y posterior descongelación de las células huésped y/o los medios de cultivo celular. Opcionalmente, el procedimiento incluye además la etapa de mezclar un inhibidor de la apoptosis adicional en los medios de cultivo en las etapas (e) o (f). En el procedimiento, los genes que codifican, respectivamente, el inhibidor de la apoptosis y la proteína de interés se pueden insertar en un único vector, o de forma alternativa, se pueden insertar en dos vectores separados. Preferiblemente, los genes que codifican, respectivamente, el inhibidor de la apoptosis y la proteína de interés se insertan en dos vectores separados, cada vector con un tipo de marcador de selección diferente al del otro vector. Opcionalmente, el procedimiento proporciona la expresión transitoria de la proteína de interés y la expresión estable o transitoria del inhibidor de la apoptosis.

En otro ejemplo, el procedimiento incluye las etapas de (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica un inhibidor de la apoptosis, (b) provisión de una célula huésped que comprende ADN que codifica un inhibidor de la apoptosis, (c) transformación o transfección de la célula o células huésped con el vector referido en la etapa (a), (d) provisión de los medios de cultivo celular, (e) cultivo de la célula o células huésped transformadas o transfectadas en el medio de cultivo bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés y el inhibidor de la apoptosis, y (f) congelación y posterior descongelación de las células huésped y/o los medios de cultivo celular. Opcionalmente, el gen que codifica el inhibidor de la apoptosis se puede integrar de manera estable en el genoma de la célula huésped. Opcionalmente, el procedimiento incluye además la etapa de mezclar un inhibidor de la apoptosis adicional en los medios de cultivo. Opcionalmente, el procedimiento proporciona la expresión transitoria de la proteína de interés y la expresión estable o transitoria del inhibidor de la apoptosis.

En otra realización, el procedimiento incluye las etapas de (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína de interés, (b) provisión de una célula huésped, (c) transformación o transfección de la célula huésped con el vector referido en la etapa (a), (d) provisión de los medios de cultivo celular, (e) provisión de un inhibidor de la apoptosis, (f) mezcla del inhibidor de la apoptosis en el medio de cultivo, (g) cultivo de la célula o células huésped en el medio de cultivo bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés, y (h) congelación y posterior descongelación de las células huésped y/o los medios de cultivo celular tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el procedimiento proporciona la expresión transitoria de la proteína de interés.

También se describe en la presente invención procedimientos de transfección mejorados en los que se pueden utilizar el uso de uno o más inhibidores de la apoptosis y mayores concentraciones de reactivo para la transfección para incrementar la eficacia de la transcripción.

También se describe en la presente invención una proteína de interés producida según cualquiera de los métodos descritos aquí. La proteína de interés puede comprender una proteína de mamífero o una proteína de no mamífero y, opcionalmente, puede comprender un receptor o un ligando. La proteína de interés puede comprender una proteína que por sí misma es capaz de inducir la apoptosis de las células de mamífero o no mamífero *in vitro* o *in vivo*, tales como el ligando Apo-2/TRAIL, el ligando Fas, o TNF-alfa.

Breve descripción de las dibujos

La Figura 1A muestra una gráfica que ilustra la viabilidad celular de las células CHO crecidas en un biorreactor de 2 litros. Los datos muestran que las células crecidas en biorreactores pueden comenzar a perder viabilidad a partir tan solo del día 3, y esta pérdida de viabilidad va seguida, a menudo, de una caída dramática de la viabilidad en el(s) día(s) posterior(es).

La Figura 1B muestra una gráfica que ilustra los resultados de tres ensayos de apoptosis realizados sobre células CHO (citadas en la Figura 1A y en el Ejemplo 1): activación de caspasa-3, fragmentación de ADN y cambios en la unión anexina/PI (cambios en la membrana plasmática ("PM")). La activación de las caspasas se detectó, por primera vez, en el día 3, el día en que se detectó la caída de viabilidad (Figura 1A).

La Figura 2 muestra un análisis de Western blot de lisatos procedentes de clones transfectados de caspasa-9-DN. Como control se utilizó un clon transfектado con un vector mpsv (independiente). El blot fue enfrentado a antisuero anti-caspasa-9 de conejo (Pharmingen) y se fue revelado utilizando quimioluminiscencia.

La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo en el que los clones 2 y 14 de la caspasa-9-DN, así como los controles (células E25 transfectadas y células transfectadas del vector mpsv), fueron incubados con un inductor de la apoptosis, la estauroporina (1 micromolar). A continuación, se tomaron muestras de las células y se analizó el % de células viables.

La Figura 4 muestra un análisis de la actividad de la caspasa-3 para muestras celulares recogidas 24 horas después de la inducción con estauroporina en concentración 1 micromolar.

Las Figuras 5-8 muestran los resultados de ensayos realizados con los clones 2 y 14 que expresan caspasa-9-DN, así como con los controles, amplificados y sembrados a 1 millón de células/ml en un biorreactor de 2 litros. Las muestras fueron recogidas diariamente y se analizó su viabilidad (Fig. 5), el recuento de células viables (Fig. 6), la

actividad de la caspasa-3 (Fig. 7) y la concentración de la proteína de interés (anticuerpo E25) secretada al medio (Fig. 8).

Las Figuras 9-10 muestran los resultados de los ensayos realizados con células CHO sembradas en placas de 60 mm y expuestas al inhibidor de la caspasa, z-VAD-fmk (añadido al cultivo celular en una concentración 100 micromolar, 48 horas después de la siembra). El inhibidor z-VAD-fmk fue añadido posteriormente al cultivo cada 24 horas. Las muestras fueron recogidas diariamente y se analizó la actividad de la caspasa-3 (Fig. 9) y el % de células viables (Fig. 10).

Las Figuras 11-12 son ejemplos comparativos que muestran los resultados de los ensayos de crecimiento de un clon que expresa Baculovirus p35 en un biorreactor de 2 litros y el análisis diario de la viabilidad celular (Fig. 11) y de la actividad de la caspasa-3 (Fig. 12). El control es un clon transfectado con un vector, cpc.

La Figura 13 muestra un diagrama de barras en el que se representan los efectos de varias concentraciones del reactivo de transfección, DMRIE-C, en la viabilidad celular.

La Figura 14 muestra una comparación de las eficiencias de transfección total y viable obtenidas para el clon 14 de caspasa-9-DN y para los controles, células CHO DP12 y células CHO-DP12 que expresan anticuerpo E25.

La Figura 15 muestra una comparación de la productividad específica (medida en títulos de ADNsc/LDH total) obtenida para el clon 14 de caspasa-9-DN y para los controles, células CHO-DP12 y células CHO-DP12 que expresan anticuerpo E25.

La Figura 16 muestra una comparación de títulos de ADNasa obtenidos para el clon 14 de caspasa-9-DN y para los controles, células CHO-DP12 y células CHO-DP12 que expresan anticuerpo E25.

Las Figuras 17 y 18 muestran la viabilidad y los títulos de caspasa-9-DN y del control E25 crecidos en biorreactores de 2 litros con variación de temperatura, medio concentrado y un nutriente.

Las Figuras 19 y 20 muestran la viabilidad y el recuento de células viables de cultivos del control E25 y del clon 14 de caspasa-9-DN sembrados en centrífugas a partir de viales congelados. Los datos fueron obtenidos por exclusión con azul de tripán.

Las Figuras 21 y 22 muestran la viabilidad y los títulos de E25 de cultivos de células de control E25 y del clon 14 de caspasa-9-DN durante la inducción de la expresión por butirato.

Descripción detallada de las realizaciones ventajosas

I. Definiciones

El término “inhibidor de la apoptosis” se utiliza aquí para referirse a una molécula o sustancia cuya expresión o presencia en un cultivo celular *in vitro* proporciona una reducción o inhibición de la apoptosis en las células cultivadas, o proporciona resistencia de las células cultivadas a los estímulos apoptóticos. El inhibidor de la apoptosis puede comprender una proteína o molécula de tipo proteína, o una molécula orgánica o inorgánica. El inhibidor de la apoptosis puede presentarse (y/o funcionar) intracelularmente, extracelularmente, o en la superficie celular (membrana) de las células cultivadas. Entre los inhibidores de apoptosis particulares contemplados por la presente invención se incluyen, pero sin limitación, el mutante dominante negativo de la caspasa-9 (caspasa-9-DN), bcl-2, baculovirus p35, caspasa-9S (Seol, D.W. *et al.*, J. Biol. Chem., 274, 2072-2076 (1999)), crmA, z-VAD-fmk, z-DEVD-fmk, B-D-fmk y z-YVAD-fmk, y variantes de los mismos. Preferiblemente, el inhibidor de la apoptosis es un inhibidor que actúa sobre una o más caspasas localizadas “downstream” en la ruta de muerte celular intracelular de la célula, como la caspasa-3. Opcionalmente, el inhibidor de la apoptosis disminuirá o reducirá, en una cantidad efectiva, la apoptosis en un cultivo celular en al menos un 50%, ventajosamente en al menos un 75%, más ventajosamente en al menos un 85%, e incluso más ventajosamente en al menos un 95%, en comparación con un cultivo de células de control que no contenga dicho inhibidor de la apoptosis. La apoptosis o actividad apoptótica en dichos cultivos celulares puede medirse y determinarse utilizando ensayos como los aquí descritos. Opcionalmente, el inhibidor de la apoptosis mejorará o aumentará, en una cantidad efectiva, el rendimiento de la proteína recombinante de interés en al menos 1 vez, y ventajosamente en al menos 2 veces, en comparación con un cultivo de células de control que no contenga dicho inhibidor de la apoptosis. Opcionalmente, el inhibidor de la apoptosis mejorará o aumentará, en una cantidad efectiva, la eficiencia de transfección en las transfecciones transitorias, ventajosamente en al menos 1 vez, y más ventajosamente en al menos 2 veces, en comparación con un cultivo de células de control que no contenga dicho inhibidor de la apoptosis.

El término “proteína de interés” se refiere a cualquier proteína que pueda ser de utilidad con fines de investigación, diagnósticos o terapéuticos. La proteína de interés puede comprender una proteína de mamífero o una proteína de no mamífero y puede, opcionalmente, comprender un receptor o un ligando. Las proteínas ejemplares de interés incluyen, pero no están limitadas a, moléculas como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina, factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimuladora del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón;

ES 2 346 659 T3

factores de coagulación como el factor VIIIC, el factor IX, el factor tisular, y el factor von Willebrands; factores anticoagulantes como la Proteína C; factor natriurético atrial; un surfactante pulmonar; un activador plasminógeno, como uroquinasa u orina humana o un activador plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; miembros de la familia de TNF y de receptores de TNF (TNFR), como el factor-alfa y -beta de la necrosis tumoral, el ligando CD40, el ligando Apo-2/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, el ligando Fas; encefalinasa; RANTES (regulador de la activación de las células T normalmente expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica como la albúmina sérica humana; una sustancia inhibidora Mülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; un péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, como la beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un 5 antígeno asociado al linfocito T citotóxico (CTLA), como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ó -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso como el NGF-b; factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblasto como el aFGF y el bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); 10 factor de crecimiento transformante (TGF) como el TGF-alfa y el TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor de crecimiento tipo insulina-I y -II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I del cerebro), proteínas de unión de los factores de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón como 15 el interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores de estimulación de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; trombopoietina (TPO); interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; dismutasa superóxido; receptores de células T; proteínas de membranas superficiales; factor acelerador de la degradación; antígeno viral como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA, gp120; proteínas de transporte; receptores de superficie; diriginas; 20 proteínas regulatorias; integrinas como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor como el receptor HER2, HER3 o HER4; y variantes y/o fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente enumerados; así como anticuerpos frente a varios抗原s como las proteínas CD como 25 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores ErbB como el receptor EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y la integrina $\alpha v/\beta 3$ incluyendo las subunidades α o β (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); 30 receptor mpl; CTLA-4; proteína C; un receptor Apo-2L como Apo-2 (DR5), DR4, DcR1, DcR2, DcR3; y variantes y/o fragmentos de los anticuerpos anteriormente identificados, etc. En una realización de la invención, una proteína de interés comprenderá una proteína que es capaz, por sí misma, de inducir la apoptosis en células de mamífero o no mamífero *in vitro* o *in vivo*, como el ligando Apo-2/TRAIL, el ligando Fas, o TNF-alfa.

35 “Aislada” cuando se utiliza para describir las diferentes proteínas de interés aquí reveladas, significa que la proteína ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían normalmente con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos de la proteína de interés, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En las realizaciones ventajosas, la proteína será purificada (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia N-terminal o interna de aminoácidos mediante la utilización de un secuenciador tipo Edman, o (2) hasta conseguir la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, ventajosamente, un colorante de plata. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de las 40 células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural de la proteína de interés no estará presente. Sin embargo, la proteína aislada se preparará, normalmente, mediante al menos una etapa de purificación.

45 El término “secuencias de control” se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma operativa en un organismo huésped específico. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un lugar de unión de un ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación e intensificadores.

50 Un ácido nucleico está “unido de forma operativa” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o secuencia líder secretora está unido de forma operativa al ADN de un polipéptido si está expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un lugar de unión de un ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia codificante si está ubicado de forma que facilite la traducción. En general, “unido de forma operativa” significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. No obstante, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios 55 de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o ligadores sintéticos de oligonucleótidos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

60 Como se utilizan aquí, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen la progenie. Así, los términos “transformantes” y “transfectantes” incluyen las células y cultivos del sujeto primario derivado del mismo sin tener en cuenta en número de transferencias.

“Fase de crecimiento” del cultivo celular se refiere al periodo exponencial de crecimiento celular (la fase logarítmica) en la que, en general, las células se dividen rápidamente. Durante esta fase, las células se cultivan durante

un periodo de tiempo, normalmente entre 1 y 4 días, y es bajo dichas condiciones cuando el crecimiento celular se maximiza. La determinación del ciclo de crecimiento de la célula huésped puede determinarse para la célula huésped específica prevista sin experimentación indebida. "Periodo de tiempo y es bajo dichas condiciones cuando el crecimiento celular se maximiza" y similares se refieren a aquellas condiciones de cultivo que, para una línea celular

5 específica, se ha determinado que son óptimas para el crecimiento y la división celulares. Durante la fase de crecimiento, las células se cultivan en un medio nutriente que contiene los aditivos necesarios generalmente a aproximadamente 30-40°C, ventajosamente a aproximadamente 37°C, en una atmósfera humidificada y controlada, de forma que se consigue un crecimiento óptimo para la línea celular específica. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un periodo de, aproximadamente, entre uno y cuatro días, normalmente entre dos y tres días.

10

"Fase de transición" del cultivo celular se refiere al periodo de tiempo durante el cual se ajustan las condiciones de cultivo para la fase de producción. Durante la fase de transición, los factores medioambientales como el pH, la concentración de iones y la temperatura pueden variar para pasar de las condiciones de crecimiento a las condiciones de producción.

15

"Fase de producción" del cultivo celular se refiere al periodo de tiempo durante el cual el crecimiento celular ha alcanzado un máximo. Durante la fase de producción, el crecimiento celular logarítmico ha finalizado y la producción de proteína es primaria. Durante este periodo de tiempo, el medio suele suplementarse para ayudar a la producción continuada de proteína y para conseguir el deseado producto de proteína.

20

El término "expresión" o "expresa" se utiliza aquí para referirse a la transcripción o traducción que se produce dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de un gen de producto en una célula huésped puede determinarse en base a la cantidad del correspondiente ARNm que está presente en una célula o a la cantidad de proteína codificada por el gen de producto que es producida por la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrit de un gen de producto se cuantifica, de forma deseable, mediante hibridización Northern. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 7.3-7.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La proteína codificada por un gen de producto puede cuantificarse mediante un ensayo para la determinación de la actividad biológica de la proteína o mediante el empleo de ensayos que son independientes de dicha actividad, como el Western blotting o el radioinmunoensayo utilizando anticuerpos que son capaces de reaccionar con la proteína. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 18.1-18.88 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

25

Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en células de mamífero o no-mamífero que suele ir acompañada por uno o más cambios celulares característicos, incluyendo condensación del citoplasma, pérdida de microvellos de la membrana plasmática, activación de caspasa(s), segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de función mitocondrial. Esta actividad puede determinarse y medirse, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular, análisis FACS, unión de anexina V, o electroforesis de ADN como es conocido en la técnica y descrito aquí más adelante.

30

II. Procedimientos de la invención

Las células crecidas en cultivo celular pueden comenzar a perder viabilidad en los días siguientes al inicio del cultivo. La pérdida de viabilidad celular puede ser particularmente problemática cuando las células se cultivan en cultivos o biorreactores relativamente grandes a escala discontinua. Por ejemplo, las células CHO crecidas en un cultivo discontinuo pueden comenzar a perder viabilidad celular tan pronto como el Día 4, tras el cual puede producirse una rápida disminución de la viabilidad hasta que el cultivo finalice. El mecanismo por el cual mueren dichas células cultivadas puede ser la necrosis o la apoptosis. Utilizando ensayos TUNEL y de unión Anexina/PI, los Solicitantes descubrieron que aproximadamente el 80% de algunas células CHO crecidas en cultivo discontinuo pueden morir por apoptosis en lugar de mediante necrosis. Como aquí se describe, los Solicitantes han encontrado, sorprendentemente, procedimientos que permiten una marcada reducción de dicha apoptosis.

35

Los procedimientos revelados en la presente aplicación presentan una gran variedad de aplicaciones y mejoras para la producción de proteínas recombinantes. Primero, al prolongar la viabilidad de la célula huésped en el cultivo (y durante la fermentación), un experto en la técnica puede incrementar la producción y el rendimiento de la proteína de interés. Esto puede mejorar la eficacia del cultivo celular y producir un marcado ahorro de costes. Además, los Solicitantes han encontrado que el uso de uno o más inhibidores de la apoptosis en los procedimientos de la invención puede servir de protección frente a los potenciales efectos adversos de agentes como el butirato o la TSA incluidos en el cultivo celular. Además, los procedimientos aquí descritos pueden mejorar la calidad de la proteína de interés expresada y recuperada. La calidad de la proteína de interés expresada y recuperada puede evaluarse utilizando técnicas conocidas en la técnica, como SDS-PAGE, etc. La ocurrencia de muerte celular en cultivos de células recombinantes resulta a menudo en la liberación de varias proteínas activas procedentes de las células agonizantes, como proteasas [Lao, M., *et al.*, *Cytotechnology*, 22:43-52 (1996); Teige, M., *et al.*, *J. Biotechnol.*, 34:101-105 (1994)], glicosidasas como la sialidasa o la β-galactosidasa [Gramer M.J. y Goochée C.F., *Biotechnol. Prog.*, 9:366-373 (1999)], o la isomerasa de prolina [Schmid, *Current Biology*, 5:933-944 (1995)]. Éstas y otras proteínas similares suelen ser capaces de degradar la calidad del producto o la función de la(s) proteína(s) recombinante(s) deseada(s) que se está(n) expresando, por ejemplo, mediante una escisión no deseada, una modificación de los carbohidratos (modificación de glicoproteína) [Wittwer A. y Howard, S.C., *Biochem.*, 29:4175-4180 (1990); Hart, *Curr. Op. Cell Biol.*, 4:1017-1023 (1992); Goochée *et al.*, *Bio/Technology*, 9:25 1347-1355 (1991)], o una modificación de la estructura de la proteína

ES 2 346 659 T3

(como plegamiento o agregación). Al disminuir o inhibir la apoptosis en el cultivo celular, los procedimientos presentes pueden disminuir el número o la presencia de dichas proteasas adversas en el medio de cultivo y proteger la proteína de interés expresada frente a la degradación proteolítica.

5 Los procedimientos aquí descritos pueden emplearse, además, para incrementar la eficiencia de transfección y la viabilidad de las células durante la transfección. Los reactivos usados en varias técnicas de transfección, como la Lipofectamina o DMRIE-C (Gibco), pueden ser relativamente tóxicos para las células cuando se utilizan en concentraciones más elevadas. La utilización de concentraciones más elevadas de reactivos de transfección, sin embargo, sería de especial utilidad para conseguir mayores eficiencias de transfección. La expresión del inhibidor de la apoptosis y/o
10 la adición del inhibidor de la apoptosis directamente al medio de cultivo celular se pueden utilizar para reducir o inhibir la muerte celular incluso cuando se seleccionan dichas concentraciones más elevadas del reactivo de transfección. La utilización de un inhibidor de la apoptosis de esta manera puede producir una mayor eficacia de transfección y en un mayor rendimiento de la proteína recombinante de interés.

15 Los procedimientos revelados pueden utilizarse, además, para expresar proteínas de interés que sean proteínas que, por sí mismas, induzcan la apoptosis. Dichas proteínas, como el ligando Apo-2/TRAIL o el ligando Fas, pueden desencadenar la apoptosis cuando se expresan en las células. La presencia de inhibidor(es) de la apoptosis, de acuerdo con los presentes procedimientos, puede bloquear dicha actividad apoptótica y permitir una expresión mejorada de la proteína de interés.
20

Además, los procedimientos se pueden utilizar para incrementar la viabilidad de las células sometidas a procesos de congelación/almacenamiento/descongelación. En general, durante estos procesos las células pueden perder viabilidad. La presencia de inhibidor(es) de la apoptosis expresados en las células (o añadidos al medio de cultivo celular) puede aumentar la viabilidad celular y ayudar a reducir o eliminar la variabilidad en las viabilidades celulares entre las 25 diferentes alícuotas o viales de células.

Los procedimientos conformes a la presente invención se describen en detalle más adelante.

El ADN codificador de la proteína de interés puede obtenerse de una gran variedad de fuentes como, por ejemplo, de cualquier librería de ADNc preparada a partir de un tejido que supuestamente posea su ARNm y que lo exprese a un nivel detectable. El gen codificador de la proteína de interés también puede obtenerse de una librería genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos. Un cribado como una librería de ADNc o genómica con una sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando los procedimientos estándares, como los descritos en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)). Un método alternativo para aislar el gen codificador de la proteína de interés es utilizar la metodología PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].
30

Varias proteínas de interés han sido expresamente citadas anteriormente y sus respectivas secuencias génicas son, en general, conocidas y están públicamente disponibles.
40

Los genes codificadores de varios inhibidores de la apoptosis también han sido descritos en la literatura [ver, por ejemplo, Clem R.J. *et al.*, *Science*, 254, 1388-1390 (1991); Duan, H. *et al.*, *J. Biol. Chemistry*, 271, 16720-16724 (1996); Pan, G. *et al.*, *J. Biol. Chemistry*, 273, 5841-5845 (1998); Vaux, D.L. *et al.*, *Science*, 258, 1955-1957 (1998); Tsujimoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:5214-5218 (1986)]. Los procedimientos de la presente invención contemplan la utilización de un único gen codificador del inhibidor de la apoptosis, así como la utilización de una combinación de dos o más genes codificadores de inhibidores de la apoptosis. Potencialmente, la expresión de dos o más tipos de inhibidores de la apoptosis en una célula huésped puede ser beneficiosa para el control de la apoptosis en el cultivo celular. Un experto en la técnica puede monitorizar la cantidad de inhibidor de la apoptosis que está siendo expresada por las células huéspedes mediante, por ejemplo, un análisis Western blot en el que se utilice un anticuerpo que reconozca al inhibidor de la apoptosis. La cantidad de inhibidor de la apoptosis, así como el momento de su expresión, pueden regularse o monitorizarse, por ejemplo, mediante la elección de un vector con un promotor inducible.
45

Cuando se selecciona un inhibidor de la apoptosis para utilizarlo en los procedimientos de las reivindicaciones, los expertos en la técnica apreciarán que varias moléculas inhibidoras de la apoptosis puedan actuar sobre diferentes componentes intracelulares de la ruta de señalización que lleva a la muerte celular. Las rutas involucradas en la muerte celular comprenden una familia de proteasas de cisteína, denominadas caspasas, que están relacionadas con la enzima conversora de interleucina-1beta de mamífero (caspasa-1) y con Ced-3, el producto de un gen de *C. elegans*. Se cree que dichas moléculas de caspasa pueden actuar, al menos, en dos niveles diferentes. Las caspasas iniciadoras suelen ser moléculas "upstream" que se activan como respuesta a ciertos estímulos indicativos de que la célula ha sido comprimida, dañada o ha recibido algún tipo de señal para que inicie la muerte celular por apoptosis. Un ejemplo de dichas caspasas "upstream" es la caspasa-8. Las caspasas iniciadoras pueden, sucesivamente, liberar y activar otra familia de caspasas "downstream", como la caspasa-3. Dependiendo de la naturaleza del estímulo apoptótico y del tipo de célula, sólo una parte de la ruta de señalización estará involucrada en el mecanismo de señalización y en la ejecución de la muerte celular. Se cree, por ejemplo, que ciertos inhibidores de la apoptosis, como CrmA, actúan sobre caspasas localizadas "upstream", como la caspasa-8, y suelen ser activados directamente por un receptor de muerte unido a un ligando. Otros inhibidores de la apoptosis actúan sobre otras caspasas localizadas "downstream" en la ruta de señalización intracelular. Así, en la actualidad se cree que los inhibidores de aquella(s) molécula(s) que están
50
55
60
65

involucradas de forma efectiva (así como las involucradas de forma activa en la transmisión de la señal) en el aparato de muerte celular en una célula seleccionada serán efectivos como inhibidores de la apoptosis, como los aquí descritos. Los Solicitantes observan, sin embargo, que los expertos en la técnica comprenderán que existe un punto en dichas rutas de señalización en la que la célula está “entregada” a la muerte celular y que, cuando la ruta de señalización ha transmitido una(s) señal(es) al punto en donde la célula se entrega a la muerte celular, las moléculas inhibidoras de la apoptosis, como las aquí descritas, pueden no resultar efectivas en la inhibición o prevención de la apoptosis de la célula “entregada”.

El modificador de la respuesta de las citoquinas, CrmA, es una serpina de 38 kDa identificada en el virus de la vi-
ruela que ha sido descrita como un inhibidor de la apoptosis en diversos sistemas [Gagliardini *et al.*, *Science*, 263:826-
828 (1994); Tewari *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:3255-3260 (1995)]. La CrmA ha sido evaluada como un inhibidor de la
caspasa-1 y de la caspasa-8 [Nicholson *et al.*, *Nature*, 376:37-43 (1995); Zhou *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:7797-7800
(1997)]. En algunos estudios llevados a cabo por los Solicitantes, se ha observado que la sobreexpresión de CrmA en
células CHO dhfr+ no es capaz de retrasar de forma sustancial la muerte celular en el entorno de un biorreactor. Este
resultado sugiere que, en este sistema específico de células CHO seleccionado por los Solicitantes, ni la caspasa-1 ni
la caspasa-8 han estado involucradas activamente en la ruta de muerte celular de dichas células cultivadas específicas. Por consiguiente, para conseguir los efectos deseados aquí descritos, resulta ventajoso seleccionar una molécula
inhibidora de la apoptosis que actúe “downstream” en la ruta de señalización de muerte celular de la célula huésped
seleccionada, pero que lo haga antes de llegar al punto en el que la célula está entregada a la muerte celular.

Los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) codificadores de la proteína de interés y del inhibidor de la apoptosis pueden insertarse en un(os) vector(es) replicable(s) para su expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno de los cuales se describe más adelante. Las secuencias de señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos intensificadores y secuencias de terminación de la transcripción opcionales que se pueden emplear son conocidos en la técnica y se describen con mayor detalle en WO97/25428.

Las técnicas de inserción de dichos genes en los vectores son bien conocidas para el experto en la técnica y dichas técnicas pueden realizarse sin experimentación indebida. Para la construcción de vectores adecuados se pueden emplear técnicas de ligación estándares. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se liberan, adaptan y vuelven a unirse en la forma deseada para generar los plásmidos necesarios. Para ello se pueden emplear técnicas conocidas en la técnica. [Ver, por ejemplo, Messing *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981); Maxam *et al.*, *Methods in Enzymology*, 65:499 (1980)].

El gen codificador del inhibidor de la apoptosis y el gen codificador de la proteína de interés pueden insertarse en un vector único (co-transfectados), o insertarse en dos vectores separados o diferentes. Los genes correspondientes se insertarán, ventajosamente, en dos vectores separados. Cada uno de estos vectores contendrá, normalmente, un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección estándares codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, neomicina, puromicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios complejos como, *por ejemplo*, el gen codificador de D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células que compiten para incorporar el ácido nucleico codificador, como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo natural es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada según se describe en Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* provee un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no presenta la capacidad de crecer en triptófano, *por ejemplo*, ATCC nº 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

En los procedimientos que emplean un primer vector que comprende un gen inhibidor de la apoptosis y un segundo vector que comprende un gen codificador de la proteína de interés, es ventajoso que el primer y el segundo vector lleven diferentes marcadores de selección. Así, por ejemplo, un vector que comprenda el gen inhibidor de la apoptosis puede llevar un gen de selección que confiera resistencia a la ampicilina, mientras que el vector que comprende el gen codificador de la proteína de interés puede llevar un gen de selección que confiera resistencia al metotrexato.

Los vectores de expresión también suelen contener un promotor, que es reconocido por el organismo huésped y que va unido de forma operativa a la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos insertada(s) descrita(s) anteriormente. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas “upstream”(5') en el codón inicial de un gen estructural (normalmente entre aprox. 100 a 1000 pares de bases) y que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia específica de ácidos nucleicos, a los que están unidos de forma operativa. Dichos promotores se incluyen normalmente dentro de dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles superiores de transcripción del ADN bajo su control como respuesta a algún cambio en las condiciones del cultivo, *por ejemplo*, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En la actualidad, se conocen un gran número de promotores reconocidos por una gran variedad de células huésped potenciales. Estos promotores están unidos de

forma operativa al ADN codificador mediante la eliminación del promotor del ADN fuente por digestión de la enzima de restricción e inserción de la secuencia aislada del promotor en el vector.

Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica, y se describen con mayor detalle en la patente WO97/25428.

Se pueden emplear vectores de expresión que provean la expresión transitoria del ADN codificador de la proteína de interés. En general, la expresión transitoria conlleva la utilización de un vector de expresión que sea capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, de forma que la célula huésped acumule varias copias del vector de expresión y, posteriormente, sintetice elevados niveles de la proteína deseada codificada por el vector de expresión [Sambrook *et al.*, *supra*]. Los sistemas de expresión transitoria, comprendiendo un vector de expresión y una célula huésped adecuados, permiten la conveniente identificación positiva de las proteínas codificadas por ADNs clonados, así como el rápido cribado de dichas proteínas en función de las propiedades biológicas y fisiológicas deseadas.

Las células huésped se transfecan o transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos para la producción de la proteína de interés y para el cultivo en medios nutrientes modificados para que resulten apropiados para inducir a los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes codificadores de las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la incorporación de un vector de expresión por parte de una célula huésped tanto si se han expresado secuencias codificantes como si no lo han hecho. Existen numerosos procedimientos de transfección conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, CaPO4 y electroporación. Una transfección satisfactoria suele reconocerse cuando se produce cualquier indicación de la operación de este vector dentro de la célula huésped. Como se ha descrito anteriormente, la utilización de un gen inhibidor de la apoptosis (o la adición de una molécula inhibidora de la apoptosis directamente al medio de cultivo) puede mejorar la eficiencia de la transfección. Se cree que la utilización de dicho(s) inhibidor(es) de la apoptosis permitirá la utilización de mayores cantidades de reactivos de transfección, como Lipofectamina o DMRIE-C (como se describe en los Ejemplos más adelante).

Los medios de transformación introducen ADN en un organismo de forma tal que el ADN sea replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante un integrante cromosómico. Dependiendo del tipo de célula huésped utilizado, la transformación se realizará utilizando técnicas estándares adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, según se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación suelen utilizarse en células procariotas u otro tipo de células que contienen sustanciales barreras célula-pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células de plantas, según se describe en Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Además, las plantas pueden transfecirse utilizando un tratamiento con ultrasonido, según se describe en WO 91/00358 publicada el 10 de enero de 1991. Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-957 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huésped de células de mamífero han sido descritos en la Patente USA nº 4.399.216. Las transformaciones en levaduras suelen llevarse a cabo conforme al procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). No obstante, también se pueden emplear otros procedimientos para introducir ADN en las células, como son la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplasma bacteriano con células intactas, o los policationes como, por ejemplo, el polibreno o la poliornitina. Para conocer diferentes técnicas de transformación de células de mamífero, ver Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336:398-352 (1988).

Las células huésped adecuadas para expresar el ADN en los vectores de la presente invención incluyen células procariota, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram negativo o Gram positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tales como *E. coli*. Existen varias cepas de *E. coli* disponibles públicamente, tales como cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,235) y K5 772 (ATCC 53,635); Enterobacter; *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como Bacilli, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P descrito en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. Aeruginosa* y *Streptomyces*.

Además de procariotas, también son adecuados los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior utilizado habitualmente.

Las células huésped adecuadas pueden derivar de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células invertebradas se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles se incluyen células del ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en el cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); dp12.CHO (EP 307,247, publicada el 15 de marzo de 1989), células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de riñón humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que se encuentra dentro de la técnica del sector.

ES 2 346 659 T3

La selección de un inhibidor de la apoptosis específico para emplearse en una célula huésped específica y de una proteína de interés específica puede llevarse a cabo sin experimentación indebida por parte de un experto en la técnica.

Las células procariotas utilizadas para producir la proteína de interés pueden cultivarse en medios de cultivo adecuados, según se describe de forma general en Sambrook *et al., supra*. Las formas específicas de los medios de cultivo que pueden emplearse para cultivar células CHO se describen en detalle en los Ejemplos más adelante. Las células huésped de mamífero utilizadas para producir la proteína de interés pueden cultivarse en una gran variedad de medios de cultivo. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células de mamífero son bien conocidas en la técnica (J. Immunol. Methods (1983)56:221-234) o pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2^a Ed., Rickwood, D. y Hames, B.D., eds. Oxford University Press, New York (1992)), y varían en función de la célula huésped específicamente seleccionada.

Ejemplos de medios de cultivos disponibles comercialmente incluyen Ham's F10 (Sigma), Medio Mínimo Esencial ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ("DMEM", Sigma). Además, se puede utilizar cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace,(1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes y Sato,(1980) Anal. Biochem., 102:255; Patentes USA n°s 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 5.122.469 ó 4.560.655; Publicación Internacional n°s WO 90/03430; y WO 87/00195. Cualquier de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/o factores de crecimiento (como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (como HEPES), nucleósidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el medicamento Gentamycin™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que suelen presentarse en concentraciones finales del rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario a la concentración apropiada que sea conocido por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y similares son las empleadas previamente con la célula huésped seleccionada para su expresión, y resultarán evidentes para el experto en la técnica. Los factores de crecimiento necesarios para una célula específica se determinan empíricamente de forma sencilla sin requerir experimentación indebida, según se describe, por ejemplo, en *Mammalian Cell Culture* (Mather, J.P. ed., Plenum Press, N.Y. (1984), y Barnes y Sato, (1980) Cell, 22:649.

Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación de la síntesis de la proteína de interés en un cultivo de células de vertebrados se describen en Gething *et al., Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al., Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060; y EP 117.058. En general, los principios, protocolos, y técnicas prácticas que permiten maximizar la productividad de los cultivos de células de mamífero pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

La cantidad de inhibidor de la apoptosis añadido directamente, o incorporado, al medio de cultivo dependerá de varios factores, como pueden ser el tipo de molécula inhibidora de la apoptosis que se está empleando, el tipo de célula huésped, las condiciones de cultivo, etc. La determinación de la concentración deseada de inhibidor de la apoptosis a añadir al medio de cultivo forma parte del estado de la técnica y puede determinarse empíricamente sin requerir experimentación indebida. Ventajosamente, una cantidad efectiva o concentración deseada del inhibidor de la apoptosis añadido directamente al medio de cultivo es la necesaria para que el inhibidor de la apoptosis penetre en la célula huésped. El experto en la técnica apreciará realmente que diferentes inhibidores de la apoptosis puedan presentar diferentes capacidades de penetración en la célula huésped y, por ello, se debe elegir una concentración que permita dicha penetración en la célula huésped. Normalmente, existirá un rango superior de concentración de inhibidor de la apoptosis que puede no ser deseable debido a que la concentración se aproxime a un rango en el que resulte adverso o tóxico para las células huésped. Como se describe posteriormente en los Ejemplos, los Solicitantes han encontrado que z-VAD-fmk puede inhibir la apoptosis cuando se añade a los cultivos celulares en una concentración aproximada de 100 micromolar. Existe una gran variedad de compuestos inhibidores de la apoptosis, como son z-VAD-fmk, z-DEVD-fmk, B-D-fmk, y z-YVAD-fmk, que se pueden obtener de empresas como Pharmigen y Enzyme Systems, Livermore, CA.

El inhibidor de la apoptosis se puede añadir directamente al medio de cultivo. El inhibidor de la apoptosis se puede añadir en cualquier momento durante el cultivo de las células. Opcionalmente, el inhibidor de la apoptosis se añade al medio de cultivo al principio (en el momento de iniciarse, día 0) del proceso de cultivo celular. Ventajosamente, dicho inhibidor de la apoptosis se añadiría al medio de cultivo durante el cultivo de las células, pero antes del momento en que se produce la inducción a la apoptosis; en general, la inducción a la apoptosis se puede observar en cultivos celulares a gran escala en el día 3 o día 4 del cultivo, por lo que el inhibidor de la apoptosis se añadirá ventajosamente antes del día 3 o del día 4. De manera opcional, la cantidad de inhibidor de la apoptosis se añade durante, o por la duración del cultivo celular, por ejemplo, de forma diaria para toda la fermentación. Como ejemplo, para un cultivo de 5 días, el inhibidor de la apoptosis se podría añadir en el día 0, y posteriormente cada 24 horas hasta que el cultivo finalice.

En la presente invención, la célula huésped seleccionada es una célula CHO, preferiblemente una célula dp12.CHO. En una realización, el medio de cultivo seleccionado contiene un componente de medio basal, tal como una formulación basada en DMEM/HAM F-12 (para conocer la composición del medio DMEM y HAM F12 y, especialmente, de un medio libre de suero, ver las formulaciones de los medios de cultivo en American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, Sexta edición, 1988, páginas 346-349) (la formulación del medio que se describe en la Patente USA n° 5.122.469 es especialmente apropiada) con concentraciones modificadas para algunos componentes, tales como aminoácidos, sales, azúcares, y vitaminas, y que opcionalmente contienen glicina, hipoxantina,

y timidina; insulina recombinante humana, peptona hidrolizada, tal como Primatone HS o Primatone RL (Sheffield, Inglaterra), o el equivalente; un agente protector de la célula, tal como Pluronic F68 o el poliol plurónico equivalente; Gentamicina; y elementos traza. Los medios de cultivo celular seleccionados son, preferiblemente, libres de suero.

5 Las proteínas de interés pueden producirse mediante crecimiento de las células huésped bajo una gran variedad de condiciones de cultivo celular. Por ejemplo, los procedimientos de cultivo celular para la producción de proteínas a gran escala o a pequeña escala son potencialmente útiles dentro del contexto de la presente invención. Los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de lecho fluidizado, un biorreactor de fibra hueca, un cultivo sobre rodillos o un sistema biorreactor de tanque agitado, en los dos últimos sistemas con o sin microportadores, y
10 operado de forma alternativa en modo discontinuo, discontinuo alimentado o continuo.

En una realización ventajosa, el cultivo celular de la presente invención se lleva a cabo en un sistema de biorreactor de tipo tanque agitado y se emplea un procedimiento de cultivo discontinuo alimentado. En el sistema de biorreactor ventajoso, el tamaño de los biorreactores es suficientemente grande como para producir la cantidad deseada de proteína de interés, como los tamaños de 1.000 litros o 12.000 litros, aunque no están limitados a dichos tamaños, pudiendo utilizar biorreactores de tamaño muy inferior (por ejemplo, 2 litros, 400 litros) o muy superior (por ejemplo, 25.000 litros, 50.000 litros). En el ventajoso cultivo discontinuo alimentado, las células huésped de mamífero y el medio de cultivo son añadidos inicialmente al recipiente de cultivo, y el cultivo se alimenta con nutrientes adicionales, administrados de forma continua o en incrementos discretos, con o sin recolección periódica de las células y/o productos antes de la finalización del cultivo. El cultivo discontinuo alimentado puede incluir, por ejemplo, un cultivo discontinuo alimentado semicontinuo, en el que se retire periódicamente todo el cultivo (incluyendo las células y el medio) y se reemplace por un medio nuevo. El cultivo discontinuo alimentado se distingue del cultivo discontinuo simple en que todos los componentes del cultivo celular (incluyendo las células y todos los nutrientes del cultivo) se añaden al recipiente de cultivo al inicio del proceso de cultivo. El cultivo discontinuo alimentado también puede distinguirse del cultivo por perfusión en tanto que el sobrenadante no es retirado del recipiente de cultivo durante el proceso, sino al finalizar el proceso de cultivo (en el cultivo por perfusión, las células son mantenidas en el cultivo mediante, por ejemplo, filtración, encapsulación, anclaje a microportadores, etc., y el medio de cultivo es continua o intermitentemente introducido y retirado del recipiente de cultivo).

30 Además, las células cultivadas se pueden propagar siguiendo cualquier esquema o rutina que pueda resultar adecuada para la célula huésped específica y para el plan de producción contemplado específico. Por ello, la presente invención contempla un procedimiento de cultivo en una única etapa o en múltiples etapas. En un cultivo en una única etapa, las células huésped se inoculan en el entorno del cultivo y las etapas del procedimiento de la presente invención se emplean durante una fase de producción única del cultivo celular. Alternativamente, se puede prever un cultivo en múltiples etapas. En el cultivo en múltiples etapas, las células se pueden cultivar en un determinado número de etapas o fases. Por ejemplo, las células pueden crecer en una primera etapa o fase de crecimiento, en el que las células, posiblemente almacenadas, se inoculan en un medio adecuado para promover el crecimiento y la elevada viabilidad. Las células se pueden mantener en la fase de crecimiento durante un periodo adecuado de tiempo mediante la adición de un medio nuevo al cultivo de las células huésped.

40 De acuerdo con el aspecto ventajoso de la invención, las condiciones de cultivo celular discontinuo alimentado o continuo han sido ideadas para mejorar el crecimiento de las células de mamífero en la fase de crecimiento del cultivo celular. En la fase de crecimiento, las células crecen bajo determinadas condiciones y durante un periodo de tiempo que está maximizado para el crecimiento. Las condiciones de cultivo, como son la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto (dO_2) y similares, son las empleadas para el huésped específico y resultarán aparentes para el experto en la técnica. En general, el pH se ajusta a un nivel entre 6,5 y 7,5 aproximadamente utilizando un ácido (por ejemplo, CO_2) o una base (por ejemplo, Na_2CO_3 o $NaOH$). Un rango de temperatura adecuado para el cultivo de células de mamífero como las células CHO se encuentra entre 30 y 38°C y, ventajosamente, a aproximadamente 37°C, y un dO_2 adecuado se encuentra entre 5 y 90% de saturación.

50 En un estado particular, las células se pueden utilizar para inocular una fase o etapa de producción del cultivo celular. Alternativamente, como se describe anteriormente, la fase o etapa de producción puede de forma continuada a la inoculación o fase o etapa de crecimiento.

55 De acuerdo con la presente invención, el entorno del cultivo celular durante la fase de producción del cultivo celular está controlado. De acuerdo con las etapas de los procedimientos aquí revelados, la concentración del inhibidor de la apoptosis en el medio de cultivo se puede manipular de forma que se alcance y mantenga el contenido y calidad deseados de la proteína de interés en el líquido de cultivo celular resultante. En un aspecto ventajoso, la fase de producción del cultivo celular viene precedida de una fase de transición del cultivo celular en la que se llevan a cabo la expresión o la adición del (de los) inhibidor(es) de la apoptosis para la fase de producción del cultivo celular. Las concentraciones del (de los) inhibidor(es) de la apoptosis se monitorizan, ventajosamente, en conexión con otros parámetros del proceso como son la osmolaridad de la fase de producción, ya que la osmolaridad puede afectar a la productividad celular específica.

65 En algunos de los procedimientos anteriormente descritos se contempla que puede ser deseable incluir una cantidad deseada de un agente como butirato o TSA al medio de cultivo celular. Existen varias formas de butirato y sus sales que son conocidas en la técnica, como son el ácido butírico y el butirato sódico, y están disponibles públicamente en fuentes como Sigma Chemical Co. El butirato ha sido descrito en la literatura por mejorar la productividad y la expresión de

proteínas en los cultivos celulares [Arts *et al.*, *Biochem J.*, 310:171-176 (1995); Gorman *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 11:7631-7648 (1983); Krugh, *Mol. Cell. Biochem.*, 42:65-82 (1982); Lamotte *et al.*, *Cytotechnology*, 29:55-64 (1999); Chotigeat *et al.*, *Cytotechnology*, 15:217-221 (1994)]. La Tricostatina A (TSA) es un inhibidor de la desacetilasa de histonas y puede actuar de forma similar al butirato en la mejora de la productividad y de la expresión de proteínas en los cultivos celulares [Medina *et al.*, *Cancer Research*, 57:3697-3707 (1997)]. Aunque el butirato presenta algunos efectos positivos en la expresión de proteínas, también es apreciado en la técnica que, a determinadas concentraciones, el butirato puede inducir la apoptosis en las células cultivadas y, en consecuencia, disminuir la viabilidad del cultivo y la densidad de células viables [Hague *et al.*, *Int. J. Cancer*, 55:498-505 (1993); Calabresse *et al.*, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 195:31-38 (1993); Fillipovich *et al.*, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 198:257-265 (1994); Medina *et al.*, *Cancer Research*, 57:3697-3707 (1997)]. En los procedimientos de la presente invención, se puede añadir una cantidad deseada de butirato o TSA al cultivo celular al comienzo de la fase de producción y, más ventajosamente, se puede añadir al cultivo celular después de llevar a cabo un cambio en la temperatura. El butirato o el TSA se pueden añadir en una cantidad deseada determinada empíricamente por los expertos en la técnica, pero, ventajosamente, el butirato se añade al cultivo celular a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mM y, más ventajosamente, a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mM.

La expresión de la proteína de interés puede medirse directamente en una muestra, por ejemplo, mediante ELISA, Southern blotting convencional, Northern blotting para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda adecuadamente marcada. Se pueden emplear varios marcadores, más comúnmente radioisótopos y, específicamente, ³-P. No obstante, también se pueden emplear otras técnicas, como el uso de nucleótidos de biotina modificada para introducción en un polinucleótido. La biotina sirve, entonces, como lugar de unión para la avidina o los antibióticos, que pueden marcarse con una amplia variedad de marcadores, como son los radionucleótidos, fluorescentes o enzimas. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo los dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos ADN-ARN o dúplex ADN-proteína. Los anticuerpos pueden marcarse y el ensayo se puede llevar a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de forma que, cuando se forma el dúplex sobre la superficie, se puede detectar la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

La expresión génica se puede medir, alternativamente, por procedimientos inmunológicos, como la tinción inmunohistoquímica de células o de cortes de tejidos y el ensayo de cultivo celular o de líquidos corporales, para cuantificar la expresión del gen de producto. En las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, normalmente mediante deshidratación y fijación, y seguidamente se la hace reaccionar con anticuerpos marcados específicos del gen de producto acoplado, en donde los marcadores suelen ser detectables visualmente, como ocurre en el caso de los marcadores enzimáticos, los marcadores fluorescentes, los marcadores luminiscentes y similares.

Los anticuerpos utilizables en la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de líquidos corporales pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero.

La recuperación o purificación de la proteína de interés suelen ser necesarias para separarla de las proteínas de células recombinantes o de polipéptidos, con el fin de obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas. En una primera etapa, el medio de cultivo o lisato se puede centrifugar para retirar restos celulares específicos. La proteína de interés se purifica posteriormente separándola de las proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siendo los siguientes procedimientos ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase reversa; cromatografía en sílica o en una resina de intercambio iónico como DEAE; cromatografía en columnas de Sefarosa-proteína A, cromatoenfoque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

La proteína de interés recuperada o purificada será normalmente analizada por uno o más de los siguientes procedimientos: electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, HPLC, espectrometría de masas de una digestión tríptica, análisis de glicoproteínas y ensayos de actividad.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos, y no están destinados a limitar de forma alguna el alcance de la presente invención.

55 Ejemplos

Los reactivos comercialmente disponibles citados en los ejemplos fueron utilizados siguiendo las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la especificación, es, a menos que se indique lo contrario, la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

Ejemplo 1

Muerte celular apoptótica en biorreactores

Células CHO (dhfr+) adaptadas y libres de suero fueron amplificadas y sembradas a 1 millón de células/ml en biorreactores de 2 litros (n=2). El medio de cultivo celular era un medio libre de suero basado en DMEM/Ham F-12 que contenía insulina recombinante humana y oligoelementos. Las células fueron crecidas a 37°C con una agitación

ES 2 346 659 T3

fijada a 275 rpm. El pH se mantuvo a 7,2 y fue ajustado automáticamente durante el experimento. Los biorreactores fueron rociados con una mezcla de oxígeno y aire. Éste es un sistema modelo que imita las condiciones existentes durante la producción a gran escala de proteínas terapéuticas.

5 Las muestras se recogieron diariamente para medir los siguientes parámetros: viabilidad celular, actividad de caspasa (Clontech), fragmentación de ADN y unión anexina/PI (Chemicon). La Figura 1A muestra la viabilidad celular determinada (mediante exclusión con azul de Tripán) en el curso de 5 días. La Figura 1B muestra que el resultado de la apoptosis fue la pérdida de viabilidad celular en el cultivo durante el periodo de 5 días.

10 Ejemplo 2

Efectos de la caspasa-9 dominante negativa en células CHO

Construcción de expresión: El ADNc de la caspasa-9 dominante negativa (“caspase-9-DN”) con marcador FLAG C-terminal (Duan, H. *et al.*, *J. Biol. Chemistry*, 271, 16720-16724 (1996); Pan, G. *et al.*, *J. Biol. Chemistry*, 273, 5841-5845 (1998)) fue subclonado en un donador de mpsv como se describe a continuación: 2 ug de vector mpsv (Genentech, Inc.) fueron digeridos con 5 U de EcoRI y 5 U de BamHI (Boehringer Mannheim) y 2 ul de tampón A (Boehringer Mannheim) en un volumen total de 20 ul durante 1 hora a 37°C. 2 ug de construcción de caspase-9-DN/pcDNA3 fueron digeridos con 5 U de HindIII y 5 U de XbaI con 2 ul de tampón B (Boehringer Mannheim) en un volumen total de 20 ul durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, se añadieron 1 ul de dNTPs 1 mM (Clontech) y 0,2 U de polimerasa Klenow (Boehringer Mannheim) a cada reacción y se continuó la incubación durante 15 minutos adicionales a 37°C.

25 Se analizaron alícuotas de cada digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La banda 1,2 kbp de ADNc de caspase-9-DN y la banda 9,7 kbp del vector mpsv linearizado fueron aisladas del gel y el ADN fue purificado utilizando GeneClean (Bio101, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 Ligación de la caspase-9-DN y del vector mpsv: 50 ng de vector y 42 ng de inserto fueron ligados en 10 ul de tampón de ligación 2X y 1 ul de ADN ligasa T4 en 20 ul de volumen total a temperatura ambiente durante 5 minutos (Boehringer Mannheim).

35 Transformación: Células competentes de DH5alpha de máxima eficiencia (Gibco BRL) fueron transformadas con 2 ul de mezcla de ligación siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se colocaron en placas LB conteniendo carbenicilina. Las colonias se seleccionaron aleatoriamente y fueron analizadas mediante digestión con restricción para identificar una colonia que contuviera la construcción correcta. La colonia nº 30 fue elegida para el trabajo posterior.

40 Transfección: Células CHO DP12 productoras de E25 [según se designa a lo largo de la presente invención, “E25” se refiere a las células CHO transfectadas que expresan un anticuerpo monoclonal humanizado frente a IgE humano; ver Presta *et al.*, *J. Immunology*, 151:2623-2632 (1993)] fueron elegidas para realizar la transfección con mpsv/caspase-9-DN y con el vector mpsv. La transfección se realizó utilizando el reactivo LipofectAMINE Plus (Gibco BRL) y se llevó a cabo de la siguiente manera:

45 Células E25 crecidas en suspensión se colocaron en placas de cultivo tisular de 60 mm (1 millón células/placa) 24 horas antes de realizar la transfección en un medio que contenía suero. El ADN necesario para la transfección se cuantificó espectrofotométricamente. Se mezclaron 2 ug de ADN con 250 ul de medio libre de suero y 8 ul de reactivo Plus, y la mezcla fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se mezclaron 12 ul de reactivo con 250 ul de medio libre de suero y se añadieron directamente a la mezcla para su posterior incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente. El medio superior de las células fue reemplazado por 5 ml de medio libre de suero nuevo y la mezcla de transfección fue añadida a la placa. Tres horas después de la transfección, el medio fue reemplazado por un medio contenido suero. 24 horas después de la transfección, cada placa transfectada fue dividida en 5 placas, a las que se aplicó una presión de selección mediante la adición de 5 ug/ml de puromicina. Los clones transfectados (resistentes a puromicina) comenzaron a aparecer dos semanas después de la transfección. De ellos, se seleccionaron diversos clones para el análisis de la expresión de caspase-9-DN mediante Western blotting.

55 Análisis de Western blot: Los clones seleccionados fueron recogidos y transferidos a una placa de 24 pocillos. Cuando alcanzaron la confluencia, las células de cada pocillo fueron lavadas con PBS y lisadas durante 3 minutos en 100 ul de tampón de lisis (3% NP 40 en PBS). Los lisados se centrifugaron durante 3 minutos a 12.000 g. El supernadante fue recuperado, mezclado con un volumen igual de tampón de carga 2x SDS reductor (Novex) y calentado a ebullición durante 3 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C. Las alícuotas de los lisados fueron sometidas a un ensayo de proteínas para determinar la concentración de proteína total utilizando el kit de reactivos para ensayo de proteínas Micro BCA (Pierce).

65 Alícuotas de los lisados correspondientes a 3 ug de proteína total fueron cargadas en un gel de Tris-glicina 10% SDS (Novex) y éste se corrió durante 1 1/2 horas. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de transferencia Immobilon-P siguiendo las instrucciones del fabricante.

ES 2 346 659 T3

La membrana fue enfrentada a suero de conejo anti-caspasa-9 (Pharmingen), seguido de antisuero de cabra anti-conejo HRP conjugado y revelada utilizando reactivo de detección ECL para Western Blotting (Amersham). Se seleccionaron clones tanto con alta como con baja expresión de caspasa-9-DN (clones 2 y 14) para una caracterización adicional. Ver la Figura 2.

5 Inducción de apoptosis con estaurosorina: Los clones 2 y 14 que expresaban niveles bajos y altos de caspasa-9-DN (respectivamente) fueron adaptados para su crecimiento en centrífugas en un medio libre de suero. Los clones se sembraron en centrífugas a 1 millón de células/ml y se adicionó un agente inductor de la apoptosis, la estaurosorina (Sigma), a una concentración final de 1 uM. Las alícuotas del cultivo se analizaron para apoptosis mediante diversos
10 ensayos: anexina/PI (Chemicon) para medir el % de células apoptóticas y mediante actividad de caspasa-3 (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ver las Figuras 3 y 4.

El efecto de la expresión de la caspasa-9-DN en la viabilidad en biorreactores de 2 litros: Los clones 2 y 14 adaptados, libres de suero y expresando caspasa-9-DN, un vector de control y células E25 no transfectadas fueron
15 amplificadas y sembradas a 1 millón de células/ml en biorreactores de 2 litros (n=2). El medio de cultivo celular era un medio libre de suero basado en DMEM/Ham F-12 que contenía insulina recombinante humana y oligoelementos. Las células se crecieron a 37°C con una agitación fijada a 275 rpm. El pH se mantuvo a 7,2 y fue ajustado automáticamente durante el experimento. Los biorreactores fueron rociados con una mezcla de oxígeno y aire. Este es un sistema modelo que imita las condiciones existentes durante la producción a gran escala de proteínas terapéuticas.

20 20 Las muestras se recogieron diariamente para medir los siguientes parámetros: viabilidad celular, densidad celular, apoptosis, activación de caspasa-3, consumo de glucosa, osmolaridad, producción de lactato y títulos E25. Ver las Figuras 5-8.

25 25 Los resultados muestran una expresión estable de caspasa-9-DN en células CHO que expresan E25. La expresión estable generó una resistencia de las células a un agente inductor de la apoptosis, la estaurosorina. La resistencia fue proporcional a los niveles de expresión de caspasa-9-DN. En el entorno de un biorreactor, el clon 14 de elevada expresión mostró una viabilidad y un recuento de células viables drásticamente prolongados en comparación con el clon 2 con menor expresión, que mostró únicamente una prolongación moderada de la viabilidad y del recuento de
30 células viables. La prolongación de la viabilidad se refleja en el retraso en el comienzo de la activación de caspasa-3 en el clon 14, en comparación con los controles. En el ensayo para la determinación de la cantidad de anticuerpo E25 secretado al medio se obtuvieron resultados no esperados. Aunque el clon 14 de caspasa-9-DN produjo una mayor prolongación de la viabilidad en el biorreactor que el clon 2, el clon 14 produjo menor cantidad de la proteína de interés (anticuerpo E25). Los datos sugieren que la elevada expresión del inhibidor de la apoptosis puede no retrasar de forma concomitante la muerte celular ni aumentar el rendimiento de la proteína de interés.

35 35 No obstante, en otro ensayo en un biorreactor de 2 litros, se obtuvo un cultivo celular de forma similar a la descrita anteriormente, a excepción de los siguientes cambios: (1) el clon 14 que expresa caspasa-9 y las células E25 de control fueron sembradas a 1 millón de células/ml; y (2) el medio era un medio concentrado libre de suero (utilizado para mejorar el aporte de nutrientes al medio) basado en DMEM/Ham F-12 con insulina y oligoelementos. Los cultivos celulares fueron crecidos durante 1 día a 37°C y, a continuación, atemperados a 33°C. El tercer día, el pH de los cultivos fue cambiado de pH 7,15 a pH 7,0, y los cultivos fueron alimentados con un medio de DMEM/Ham F-12 concentrado, glucosa e hidrolisato de proteína con el fin de suministrar suficientes nutrientes para soportar un crecimiento óptimo.

40 40 45 Los resultados se muestran en las Figuras 17 y 18. Como se ilustra en las gráficas, la expresión de caspasa-9-DN generó una prolongación de la viabilidad y un aumento de las densidades de células viables, así como mayores títulos de la proteína de interés (anticuerpo E25) en comparación con el control. Bajo las condiciones de cultivo discontinuo alimentado en el que no se limitaron los nutrientes, los datos muestran que la prolongación de la viabilidad y el aumento de las densidades de células viables se acompañaron de un marcado aumento en los títulos de producto.

Ejemplo 3

55 *Efectos del inhibidor de caspasa z-VAD-fmk en la apoptosis*

Células CHO (dhfr+) crecidas en suspensión fueron sembradas a 1 millón de células/ml en placas para cultivo tisular de 60 mm. El medio de cultivo celular era un medio libre de suero basado en DMEM/Ham F-12 que contenía insulina recombinante humana y oligoelementos. La viabilidad del cultivo en el día 0 era del 96%. Se analizaron diariamente dos placas para determinar la viabilidad mediante exclusión con azul de tripán y mediante unión anexina/PI (Clontech) y para determinar la densidad de células viables. El experimento fue llevado a cabo durante 10 días. Un inhibidor químico de caspasas, el z-VAD-fmk (Enzyme Systems Products), fue disuelto en DMSO para obtener un stock 100 mM (1000x), del que se añadieron 4 ul a una placa de 60 mm que contenía 4 ml de cultivo. El inhibidor fue añadido 48 horas después del inicio del experimento (antes del comienzo de la apoptosis) y se adicionó una nueva alícuota de inhibidor z-VAD-fmk cada 24 horas. Los controles fueron cultivados sin adición alguna y los cultivos con la adición de DMSO exclusivamente.

Los resultados se muestran en las Figuras 9-10.

ES 2 346 659 T3

El compuesto químico, z-VAD-fmk, es un inhibidor de caspasas y, cuando se adiciona al cultivo en una concentración 100 uM, genera una inhibición de la actividad de la caspasa-3 y una prolongación de la viabilidad celular.

Ejemplo 4

5

Expresión de Baculovirus p35 en células CHO

Construcción de expresión: El ADNc de baculovirus p35 (Beidler, D. *et al.*, *J. Biol. Chemistry*, 270, 16526-16528 (1995); Clem, R.J. *et al.*, *Science*, 254, 1388-1390 (1991)) fue subclonado a partir de un vector pcDNA3 (Invitrogen) en un vector donador CPC de la siguiente manera: 2 ug de vector CPC (Genentech, Inc.) fueron linearizados mediante digestión en 25 ul conteniendo 7 U de EcoRI y 7 U de XbaI en tampón High (Boehringer Mannheim) durante 2 horas a 37°C. El ADNc de baculovirus p35 fue cortado del vector pcDNA 3 (Invitrogen) con las mismas enzimas de restricción. Una aliquota de cada reacción fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% conteniendo bromuro de etidio. Las bandas correspondientes al vector CPC linearizado (9,7 kbp) y al ADNc de p35 (0,9 kbp) fueron sacadas del gel y aisladas utilizando GeneClean (Bio 101, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación: 50 ng de vector y 25 ng de ADNc de p35 fueron mezclados con 10 ul de tampón de ligación T4 y 1 ul de ADN ligasa T4 (Kit de ligación rápida de ADN, Boehringer Mannheim) en 20 ul de volumen total de reacción. La reacción fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

20

Transformación: 100 ul de células competentes de DH5alpha de máxima eficiencia (Boehringer Mannheim) fueron mezclados con 2 ul de mezcla de ligación y la mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos. Las células fueron sometidas a calor durante 45 segundos a 42°C, seguido de incubación en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 0,9 ml de medio LB a las células y éstas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C bajo agitación. Se colocaron 100 ul de células transformadas en una placa de agar LB con carbenicilina. Cuatro clones fueron escogidos aleatoriamente y crecidos durante toda la noche en 4 ml de LB+carbenicilina. El plásmido fue aislado de estas colonias utilizando QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos aislados fueron sometidos a una digestión analítica para confirmar la correcta construcción.

30 Expresión de baculovirus p35 en células CHO: Células CHO (dhfr+) crecidas en una medio DMEM/Ham F-12 que contenía 2% de suero fetal bovino (Gibco), insulina recombinante humana y oligoelementos fueron colocadas 48 horas antes de la transfección a 2 millones de células/100 m de placa de cultivo tisular. El reactivo LipofectAMINE Plus (Gibco BRL) fue utilizado para la transfección, que fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células CHO fueron transfectadas con una construcción p35/CPC y un solo vector CPC como control. Una placa transfectada de cada tipo fue recogida 24 horas después de la transfección para determinar el nivel de expresión de p35 en los transfectantes transitorios (Western blotting utilizando suero anti-p35 políclonal de conejo a una dilución 1:1000). Otras placas transfectadas fueron crecidas adicionalmente y se les aplicó presión de selección (5 ug/ml de puromicina) 48 horas después de la transfección. Aproximadamente dos semanas después, las colonias resistentes a la puromicina fueron reveladas y adaptadas al crecimiento libre de suero y amplificadas para su posterior análisis.

40 El efecto de la expresión de p35 en la viabilidad en biorreactores de 2 litros: El clon adaptado libre de suero que expresa p35 y un vector de control fueron amplificados y sembrados a 1 millón de células/ml en biorreactores de 2 litros (n=2). El medio de cultivo celular era un medio libre de suero basado en DMEM/Ham F-12 que contenía insulina recombinante humana y oligoelementos. Las células fueron crecidas a 37°C con una agitación fijada a 275 rpm. El pH se mantuvo a 7,2 y fue ajustado automáticamente durante el experimento. Los biorreactores fueron rociados con una mezcla de oxígeno y aire. Éste es un sistema modelo que imita las condiciones existentes durante la producción a gran escala de proteínas terapéuticas. Las muestras se recogieron diariamente para medir los siguientes parámetros: viabilidad celular, densidad celular, apoptosis, activación de caspasa-3, consumo de glucosa, osmolaridad y producción de lactato.

50 Los resultados se muestran en las Figuras 11-12.

55 Los resultados indican que el inhibidor de la apoptosis, baculovirus p35, cuando se expresa en células CHO, produce una prolongación de la viabilidad en el entorno del biorreactor.

Ejemplo 5

Aumento de la eficiencia de la transfección y de la expresión de anticuerpo E25 en transfecciones transitorias utilizando caspasa-9-DN

60 Las células CHO DP12 adaptadas y libres de suero fueron sembradas a 1,5 millones de células/ml en placas de cultivo tisular no tratadas de 12 pocillos en un medio basado en DMEM/HAM F-12 con concentraciones modificadas de algunos componentes y conteniendo insulina recombinante humana, oligoelementos y suero. La transfección fue realizada utilizando DMRIE-C (Gibco BRL) conforme a las instrucciones del fabricante. El clon 14 que expresa caspasa-9-DN fue transfектado cerca de los controles, que fueron células CHO DP12 y células E25 (CHO DP12 que expresan E25).

ES 2 346 659 T3

El vector que expresa GFP con desplazamiento al rojo (Quantum Biotechnologies Inc.) fue contrransfectado con un vector que expresa ADNasa [Shak, S. *et al.*, (1990), *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 87:9188-9192)]. 24 horas después de la transfección, se añadió ioduro de propidio a una alícuota del cultivo y se midieron las eficiencias de transfección total y viable mediante citometría de flujo en FACSCalibur (Becton Dickinson). Cinco días después de la transfección, 5 una muestra del medio fue sometida a análisis de títulos de ADNasa utilizando ELISA.

Los datos indican (Fig. 13) que el reactivo de transfección, en nuestro experimento el DMRIE-C, puede resultar tóxico para las células cuando se utiliza en concentraciones más elevadas (por encima de 6 ul). En la Figura 14, el clon 14 de caspasa-9-DN muestra (en todas las concentraciones de DMRIE-C probadas) mayores eficiencias de transfección 10 total y viable que los controles. La eficiencia de transfección del clon 14 aumentó con la cantidad de reactivo de transfección y alcanzó su máximo a 12 ul de DMRIE-C, concentración a la cual ambos controles ya habían comenzado a mostrar una disminución en la eficiencia de transfección. Es posible que la eficiencia de transfección del clon 14 aumente aún más cuando se utilicen cantidades de DMRIE-C superiores a las actualmente probadas. El aumento de la eficiencia de transfección del clon 14 se vio reflejado en la productividad específica (títulos ADNasa/LDH total) del 15 cultivo y en los títulos de ADNasa (Figs. 15, 16), que aumentaron ambos en un factor de cuatro en comparación con los controles.

Ejemplo 6

20 *Efecto de la expresión de la caspasa-9-DN en la viabilidad y en el número de células viables tras la descongelación de un cultivo congelado*

25 2 x 10 células de clon 14 que expresa caspasa-9-DN y células E25 de control fueron congeladas en un medio de congelación (1 g/l de metilcelulosa en DMEM/Ham F-12 modificado y 10% de DMSO) y almacenadas a -80°C durante un extenso periodo de tiempo. El día del experimento, los viales de células congeladas fueron sacados del congelador, descongelados a 37°C e introducidos en una centrífuga con un medio de crecimiento precalentado (DMEM/Ham F-12 modificado). Las células fueron cultivadas durante 8 días y analizadas para determinar la viabilidad y la densidad de células viables.

30 Los resultados se muestran en las Figuras 19 y 20. Los resultados indican que las células que expresan caspasa-9-DN conservaron una mayor viabilidad y un mayor recuento de células viables que las células E25 de control. Con ello, se deduce que la expresión de caspasa-9-DN en las células CHO tiene un efecto beneficioso en la viabilidad y en las densidades de células viables tras la descongelación de los cultivos celulares congelados.

Ejemplo 7

Las células que expresan caspasa-9-DN presentan resistencia al butirato

40 El siguiente estudio fue realizado para determinar si la expresión de caspasa-9-DN afecta a la resistencia de las células a los potenciales efectos adversos del butirato.

45 Las células del clon 14 que expresan caspasa-9-DN y las células E25 de control fueron sembradas a 1×10^6 células/ml en placas de cultivo tisular de 60 mm. Cada placa contenía 4 ml de medio de cultivo. Los cultivos fueron crecidos a 37°C en un medio concentrado basado en DMEM/Ham F-12 con insulina y oligoelementos. El segundo día, los cultivos fueron atemperados a 33°C y el tercer día se les añadió butirato a concentraciones finales variables (0, 1, 2, 3, 5, 10 mM) (n=2). La viabilidad de los cultivos y títulos fue examinada diariamente.

50 Los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22. Los resultados muestran que las células E25 de control pierden viabilidad más rápidamente que las células que expresan caspasa-9-DN (ver la Fig. 21, día 7 y día 9). Esta pérdida se refleja en los títulos de la proteína de interés. Los títulos mostrados en la Fig. 22 indican que las células de caspasa-9-DN proporcionaron mayores títulos que la adición 0 de butirato en cultivos con butirato 1, 2, 3 y 5 mM. Por otra parte, los títulos de los controles E25 mejoraron con sólo adicionar butirato en concentración 1 y 2 mM. Los resultados sugieren que la expresión de caspasa-9-DN protege a las células de los efectos adversos del butirato y puede generar una mayor viabilidad y títulos más elevados.

55

Referencias citadas en la descripción

60 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 65 • WO 9835986 A [0009]
• WO 9725428 A [0042] [0048]

ES 2 346 659 T3

- WO 8905859 A [0052]
- WO 9100358 A [0052]
- 5 • US 4399216 A [0052]
- DD 266710 [0053]
- 10 • EP 307247 A [0055]
- US 4767704 A [0058]
- US 4657866 A [0058]
- 15 • US 4927762 A [0058]
- US 5122469 A [0058] [0062]
- US 4560655 A [0058]
- 20 • WO 9003430 A [0058]
- WO 8700195 A [0058]
- 25 • EP 117060 A [0059]
- EP 117058 A [0059]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 30 • Barr *et al. Bio/Technology*, 1994, vol. 12, 487-493 [0002]
- Steller *et al. Science*, 1995, vol. 267, 1445-1449 [0002]
- 35 • Itoh *et al. Cell*, 1991, vol. 66, 233-243 [0002]
- Suzuki E. *et al. Cytotechnology*, 1997, vol. 23, 55-59 [0003]
- 40 • Al-Rubeai, M.; Singh R. P. *Curr. Opin. Biotech*, 1998, vol. 9, 152-156 [0003]
- Mercille S.; Massie B. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, vol. 44, 1140-1154 [0003]
- 45 • Singh R. P. *et al. Biotechnol. Bioeng.*, 1994, vol. 44, 720-726 [0003]
- Zanghi A. *et al. Biotech. Bioeng.*, 1999, vol. 64, 108-119 [0003]
- 50 • Steller. *Science*, 1995, vol. 267, 1445 [0004]
- Chinnaiyan *et al. Science*, 1997, vol. 275, 1122-1126 [0004]
- Wang *et al. Cell*, 1997, vol. 90, 1-20 [0004]
- 55 • Chinnaiyan; Dixit. *Current Biology*, 1996, vol. 6, 555-562 [0004]
- Fraser; Evan. *Cell*, 1996, vol. 85, 781-784 [0004]
- Tartaglia *et al. Cell*, 1993, vol. 74, 845-853 [0004]
- 60 • Hsu *et al. Cell*, 1996, vol. 84, 299-308 [0004]
- Nagata. *Cell*, 1997, vol. 88, 355 [0004]
- Cleaveland; Ihle. *Cell*, 1995, vol. 81, 479-482 [0004]
- 65 • Chinnaiyan *et al. Cell*, 1995, vol. 81, 505-512 [0005]
- Boldin *et al. J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 387-391 [0005]

ES 2 346 659 T3

- **Chinnaiyan et al.** *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 4961-4965 [0005]
- **Boldin et al.** *Cell*, 1996, vol. 85, 803-815 [0005]
- 5 • **Muzio et al.** *Cell*, 1996, vol. 85, 817-827 [0005]
- **Ray et al.** *Cell*, 1992, vol. 69, 597-604 [0006]
- 10 • **Tewari et al.** *Cell*, 1995, vol. 81, 801-809 [0006]
- **Enari et al.** *Nature*, 1995, vol. 375, 78-81 [0006]
- 15 • **Tewari et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 3255-3260 [0006] [0041]
- **Tewari et al.** *Curr. Op. Genet. Develop.*, 1996, vol. 6, 39-44 [0007]
- 20 • **Verma et al.** *Genes Develop.*, 1996, vol. 9, 2723-2735 [0007]
- **Baldwin.** *Ann. Rev. Immunol.*, 1996, vol. 14, 649-681 [0007]
- 25 • **Ashkenazi et al.** *Science*, 1998, vol. 281, 1305-1308 [0008]
- **Nagata.** *Cell*, 1997, vol. 88, 355-365 [0008]
- 30 • **Murray et al.** *Biotech. Bioeng.*, 1996, vol. 51, 298-304 [0009]
- **Itoh et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, vol. 48, 118-122 [0009]
- **Mastrangelo et al.** *TIBTECH*, 1998, vol. 16, 80-95 [0009]
- 35 • **Simpson et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, vol. 54, 1-16 [0009]
- **Singh et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, vol. 52, 166-175 [0009]
- 40 • **Goswami et al.** *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, vol. 62, 632-640 [0009]
- **Seol, D. W. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 2072-2076 [0020]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 7.3-7.57 [0029]
- 45 • **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 18.1-18.88 [0029]
- **Lao, M. et al.** *Cytotechnology*, 1996, vol. 22, 43-52 [0032]
- **Teige, M. et al.** *J. Biotechnol.*, 1994, vol. 34, 101-105 [0032]
- 50 • **Gramer M. J.; Goochée C. F.** *Biotechnol. Prog.*, 1999, vol. 9, 366-373 [0032]
- **Schmid.** *Current Biology*, 1995, vol. 5, 933-944 [0032]
- **Wittwer A.; Howard, S. C.** *Biochem.*, 1990, vol. 29, 4175-4180 [0032]
- 55 • **Hart.** *Curr. Op. Cell Biol.*, 1992, vol. 4, 1017-1023 [0032]
- **Goochée et al.** *BioTechnology*, 1991, vol. 9, 1347-1355 [0032]
- 60 • **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0037]
- **Dieffenbach et al.** *PCR Primer: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0037]
- 65 • **Clem R. J. et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 1388-1390 [0039]
- **Duan, H. et al.** *J. Biol. Chemistry*, 1996, vol. 271, 16720-16724 [0039] [0079]
- **Pan, G. et al.** *J. Biol. Chemistry*, 1998, vol. 273, 5841-5845 [0039] [0079]

ES 2 346 659 T3

- **Vaux**, D. L. *et al. Science*, 1998, vol. 258, 1955-1957 [0039]
- **Tsujimoto** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, vol. 83, 5214-5218 [0039]
- 5 • **Gagliardini** *et al. Science*, 1994, vol. 263, 826-828 [0041]
- **Nicholson** *et al. Nature*, vol. 376, 37-43 [0041]
- 10 • **Zhou** *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 7797-7800 [0041]
- **Messing** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1981, vol. 9, 309 [0043]
- 15 • **Maxam** *et al. Methods in Enzymology*, 1980, vol. 65, 499 [0043]
- **Urlaub** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0045]
- 20 • **Stinchcomb** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0045]
- **Kingsman** *et al. Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0045]
- 25 • **Tschemper** *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0045]
- **Jones**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0045]
- 30 • **Shaw** *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0052]
- **Virology**, 1978, vol. 52, 456-457 [0052]
- **Van Solingen** *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0052]
- 35 • **Hsiao** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, vol. 76, 3829 [0052]
- **Keown** *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0052]
- 40 • **Mansour** *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0052]
- **Graham** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0055]
- **Urlaub; Chasin**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0055]
- 45 • **Mather**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0055]
- **J. Immunol. Methods**, 1983, vol. 56, 221-234 [0057]
- **Animal Cell Culture: A Practical Approach**. Oxford University Press, 1992 [0057]
- 50 • **Ham; Wallace**. *Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0058]
- **Barnes; Sato**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0058]
- **Mammalian Cell Culture**. Plenum Press, 1984 [0058]
- 55 • **Barnes; Sato**. *Cell*, 1980, vol. 22, 649 [0058]
- **Gething** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0059]
- **Mantel** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0059]
- 60 • **Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach**. IRL Press, 1991 [0059]
- **American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas**. 1988, 346-349 [0062]
- **Arts** *et al. Biochem J.*, 1995, vol. 310, 171-176 [0069]
- 65 • **Gorman** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1983, vol. 11, 7631-7698 [0069]
- **Krugh**. *Mol. Cell. Biochem.*, 1982, vol. 42, 65-82 [0069]

ES 2 346 659 T3

- **Lamotte** et al. *Cytotechnology*, 1999, vol. 29, 55-64 [0069]
- **Chotigeat** et al. *Cytotechnology*, 1994, vol. 15, 217-221 [0069]
- 5 • **Medina** et al. *Cancer Research*, 1997, vol. 57, 3697-3707 [0069]
- **Hague** et al. *Int. J. Cancer*, 1993, vol. 55, 498-505 [0069]
- 10 • **Calabresse** et al. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1993, vol. 195, 31-38 [0069]
- **Fillipovich** et al. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1994, vol. 198, 257-265 [0069]
- 15 • **Thomas**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0070]
- **Presta** et al. *J. Immunology*, 1993, vol. 151, 2623-2632 [0083]
- **Beidler**, D. et al. *J. Biol. Chemistry*, 1995, vol. 270, 16526-16528 [0096]
- 20 • **Clem**, R. J. et al. *Science*, 1991, vol. 254, 1388-1390 [0096]
- **Shak**, S. et al. *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 1990, vol. 87, 9188-9192 [0104]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fabricar proteínas recombinantes utilizando uno o más inhibidores de la apoptosis, que comprende las etapas de:

- (a) provisión de un vector que comprende un gen que codifica una proteína de interés;
- (b) provisión de una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO);
- (c) transformación o transfección de la célula huésped con el vector de la etapa (a);
- (d) provisión de los medios de cultivo celular;
- (e) provisión de una cantidad de inhibidor de caspasa z-VAD-fmk;
- (f) mezclar el inhibidor de caspasa en los medios de cultivo celular;
- (g) cultivo de la célula huésped transformada o transfectada en el medio de cultivo celular bajo las condiciones suficientes para la expresión de la proteína de interés; y, opcionalmente
- (f) recuperación o purificación de la proteína de interés de la célula huésped y/o del medio de cultivo celular.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las células huésped son cultivadas bajo condiciones para la expresión transitoria de la proteína de interés.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína de interés comprende una proteína que es capaz de inducir la apoptosis en una célula de mamífero o de no mamífero.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo celular es un medio libre de suero.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, tras la etapa (g), la célula o células huésped y/o el medio de cultivo celular se congelan y posteriormente se descongelan.

35

40

45

50

60

65

ES 2 346 659 T3

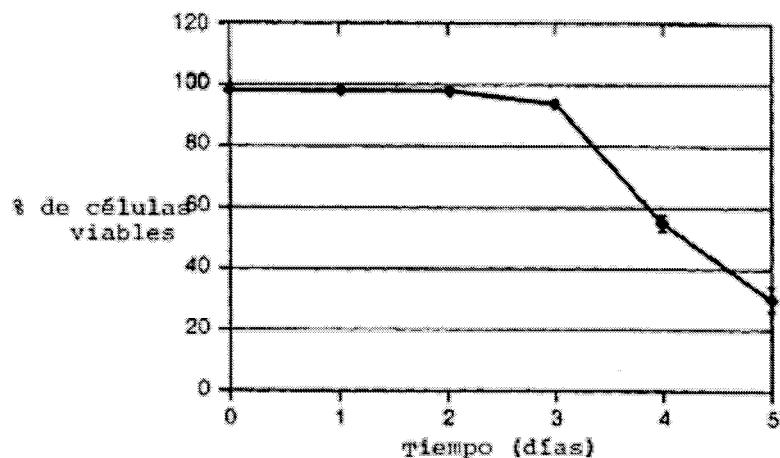


FIG._ 1A

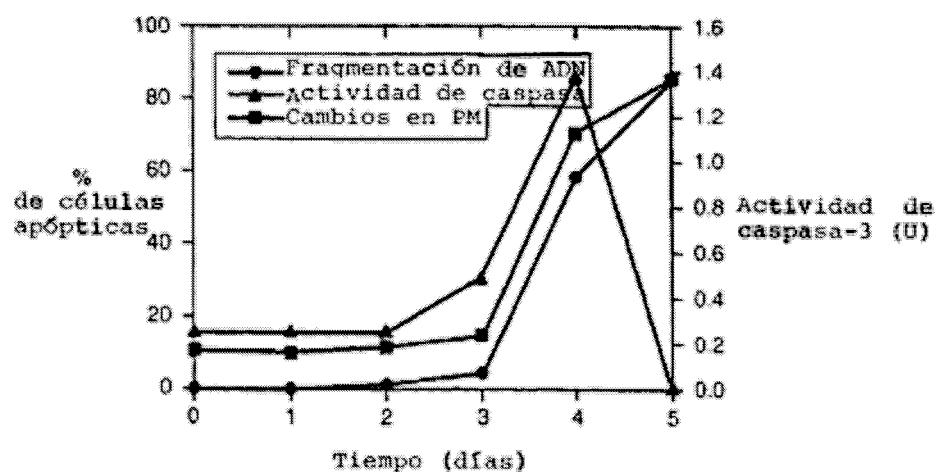


FIG._ 1B

ES 2 346 659 T3

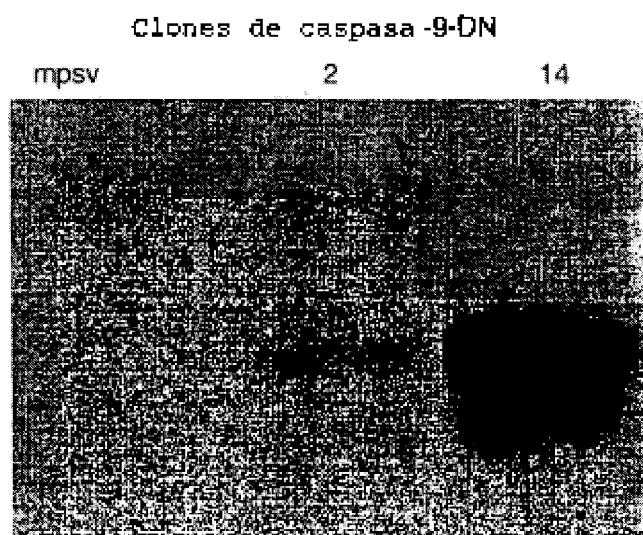


FIG._2

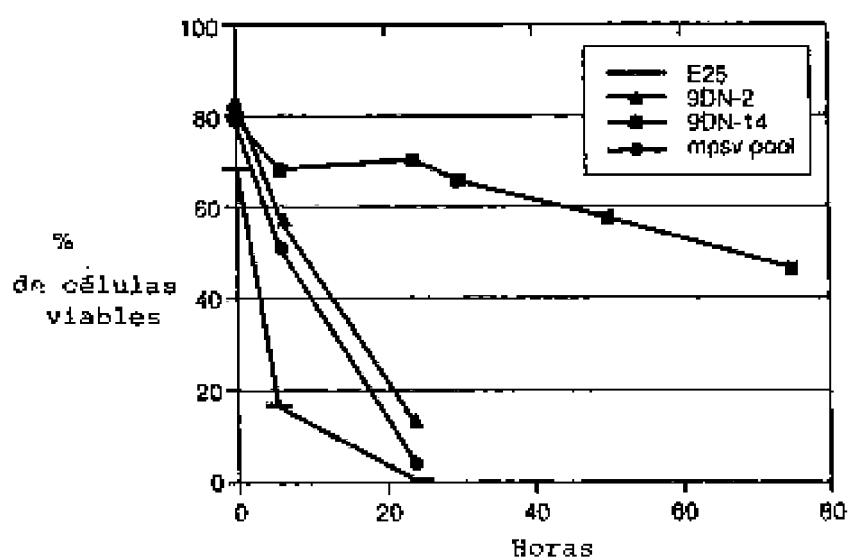


FIG._3

ES 2 346 659 T3

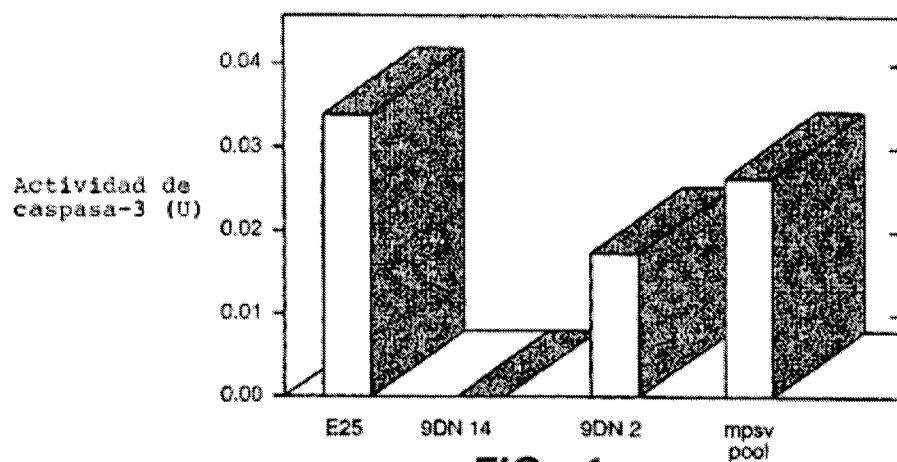


FIG._4

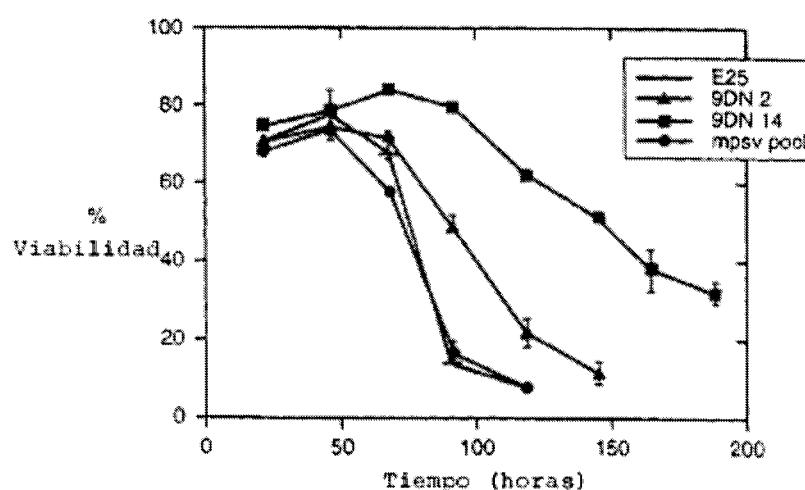


FIG._5

ES 2 346 659 T3

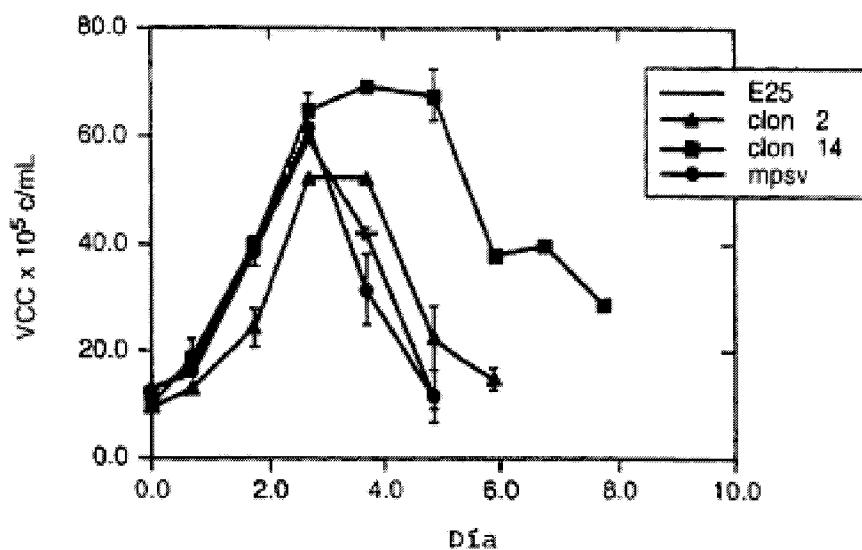


FIG.-6

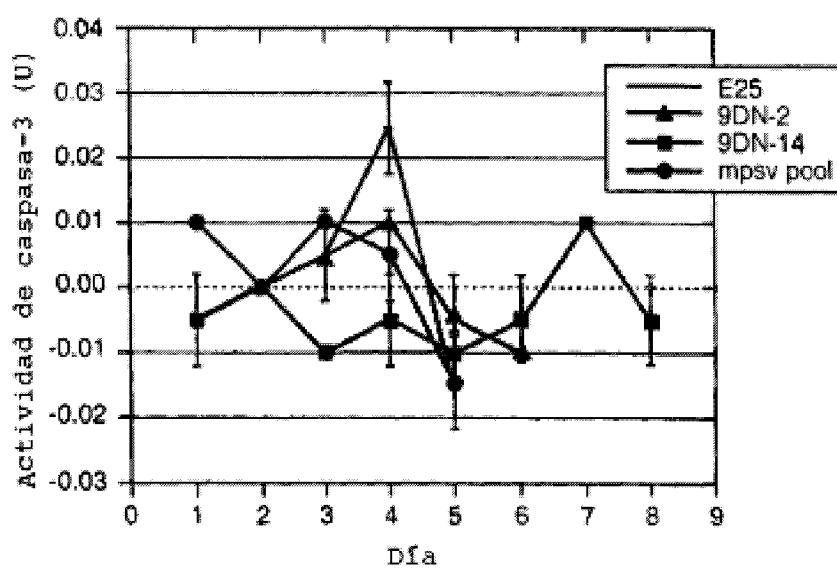


FIG.-7

ES 2 346 659 T3

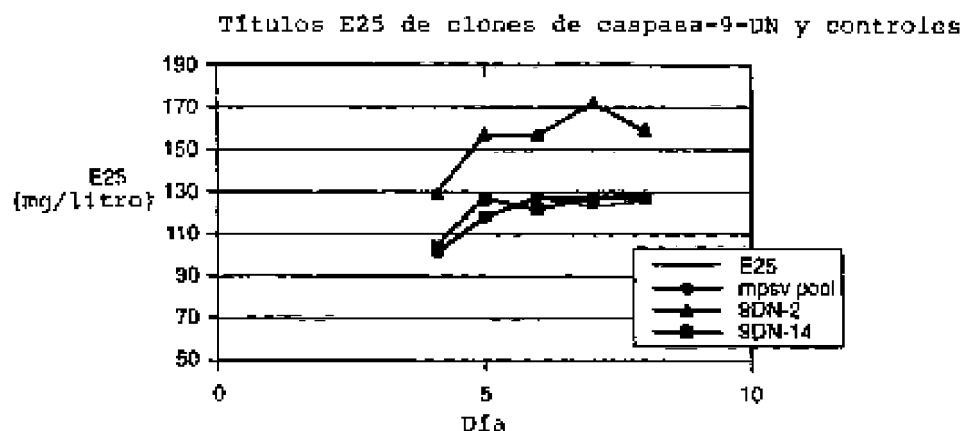


FIG._8

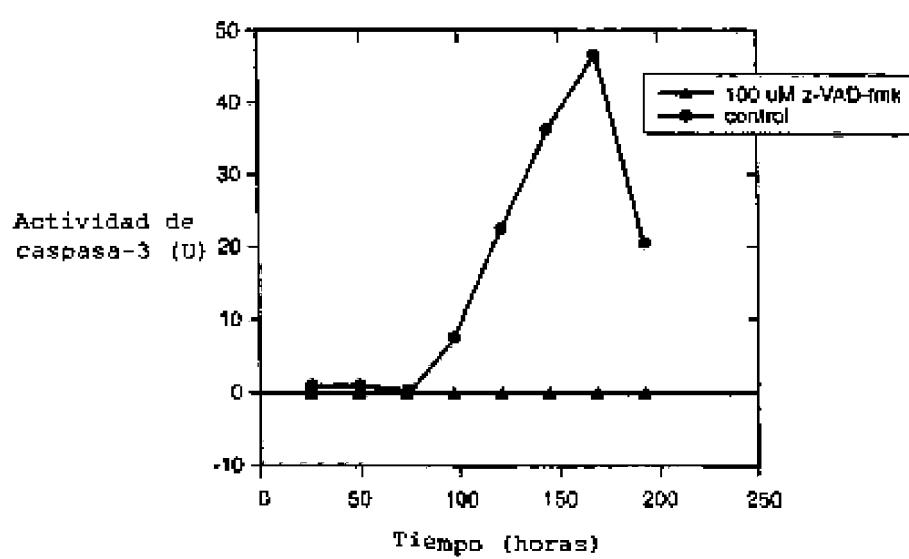


FIG._9

ES 2 346 659 T3

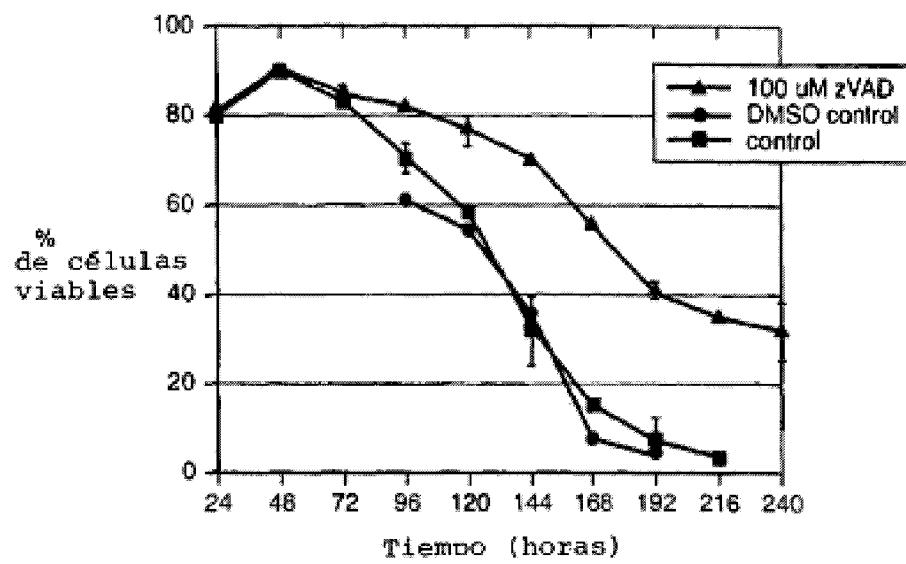


FIG._ 10

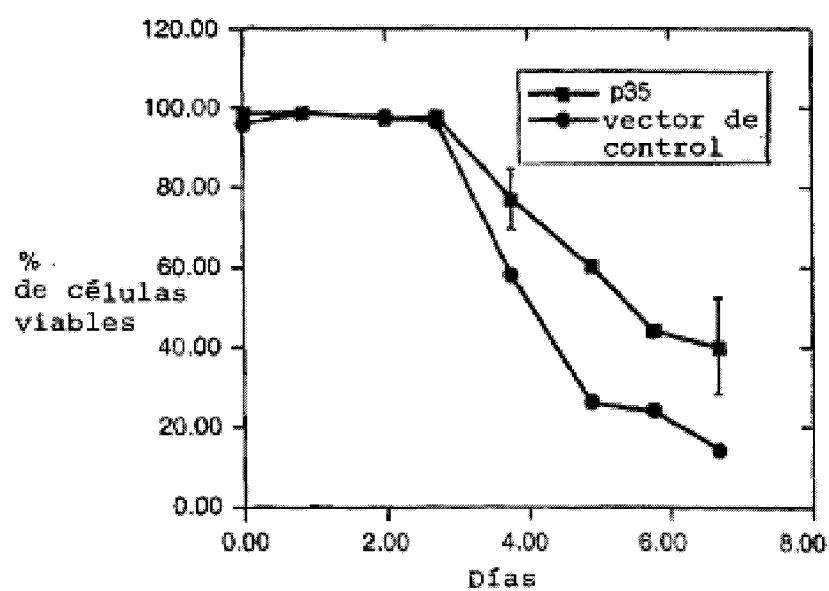


FIG._ 11

ES 2 346 659 T3

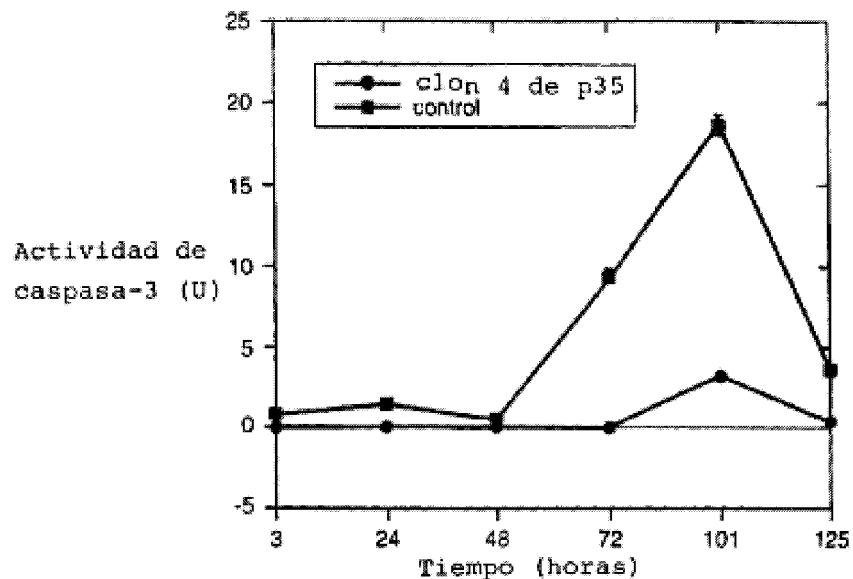


FIG.- 12

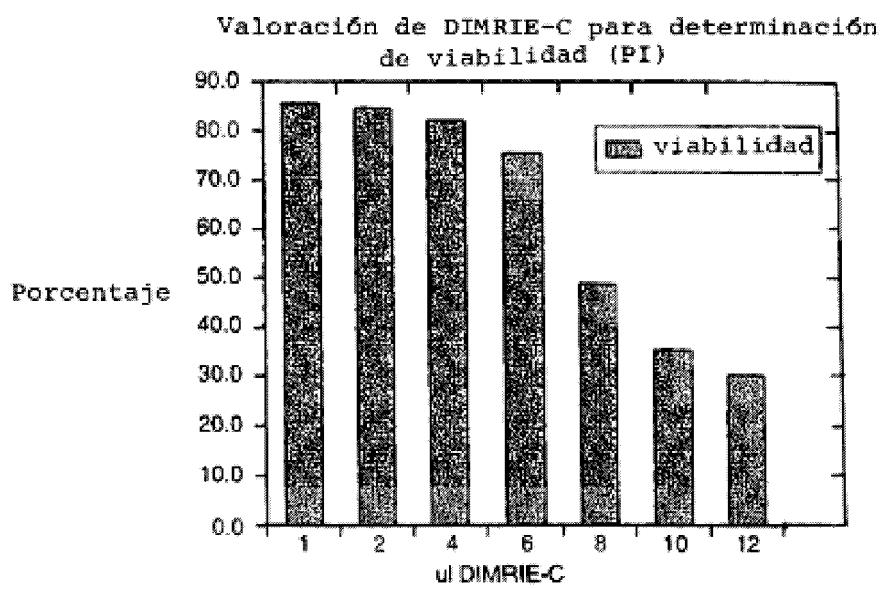
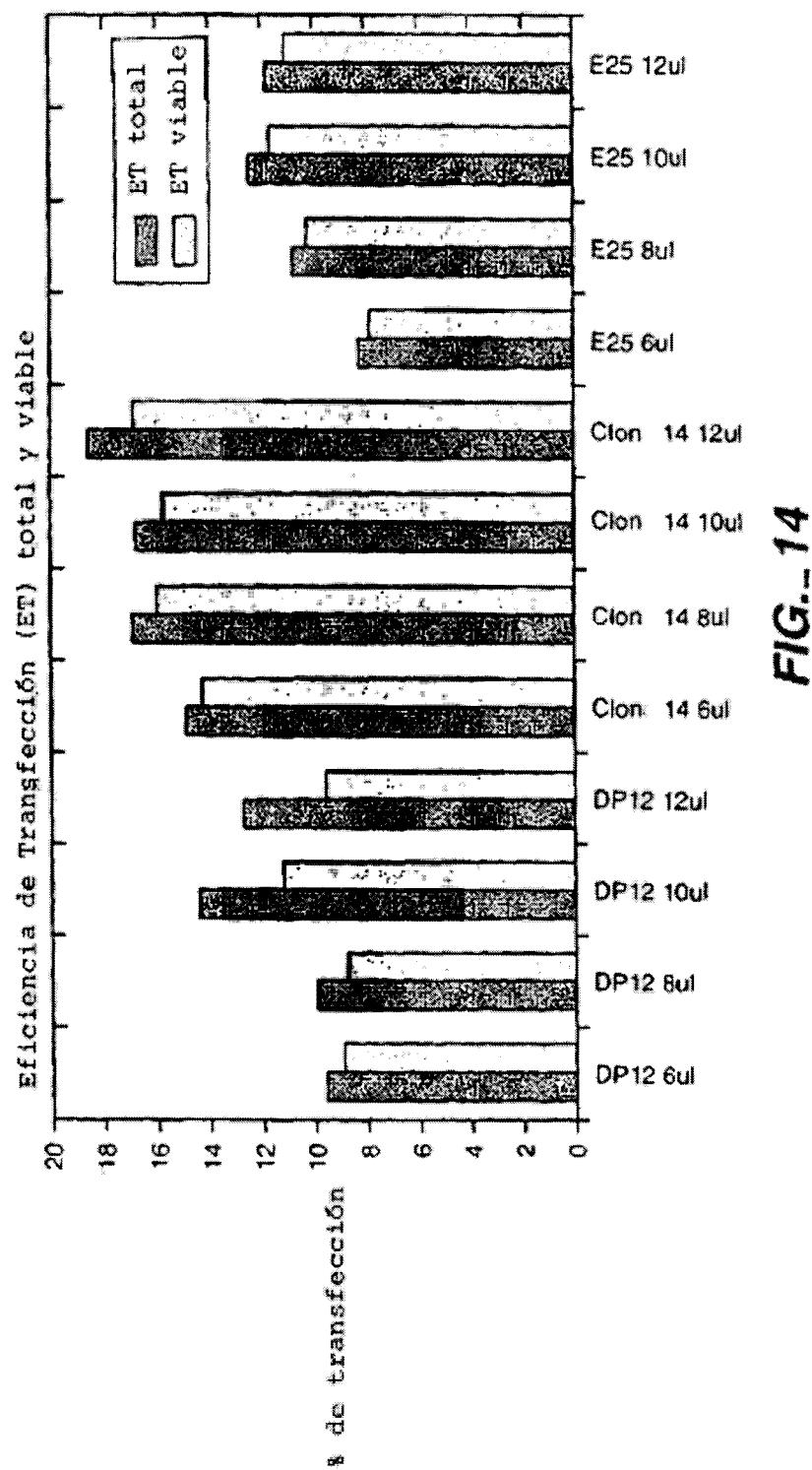


FIG.- 13



ES 2 346 659 T3

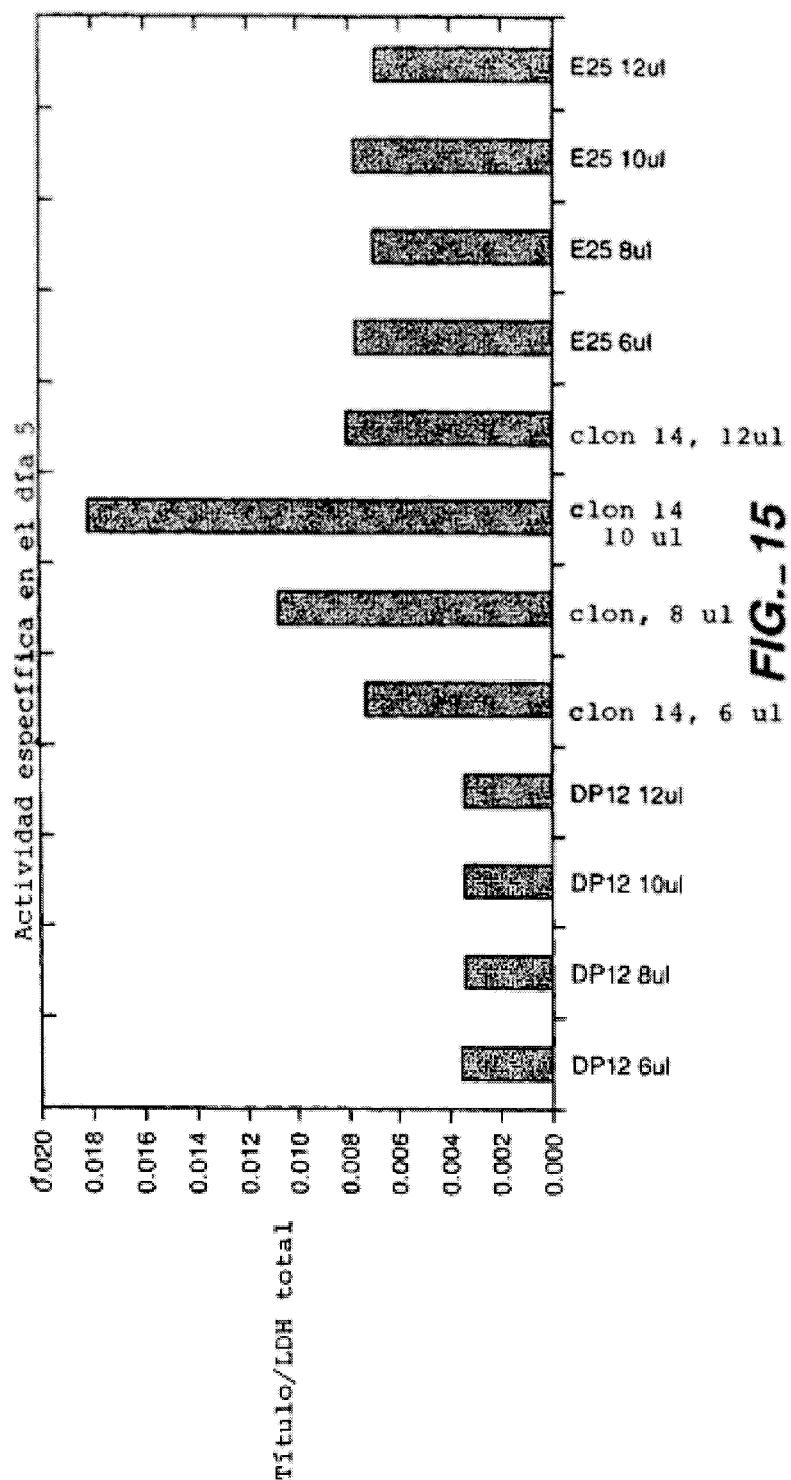
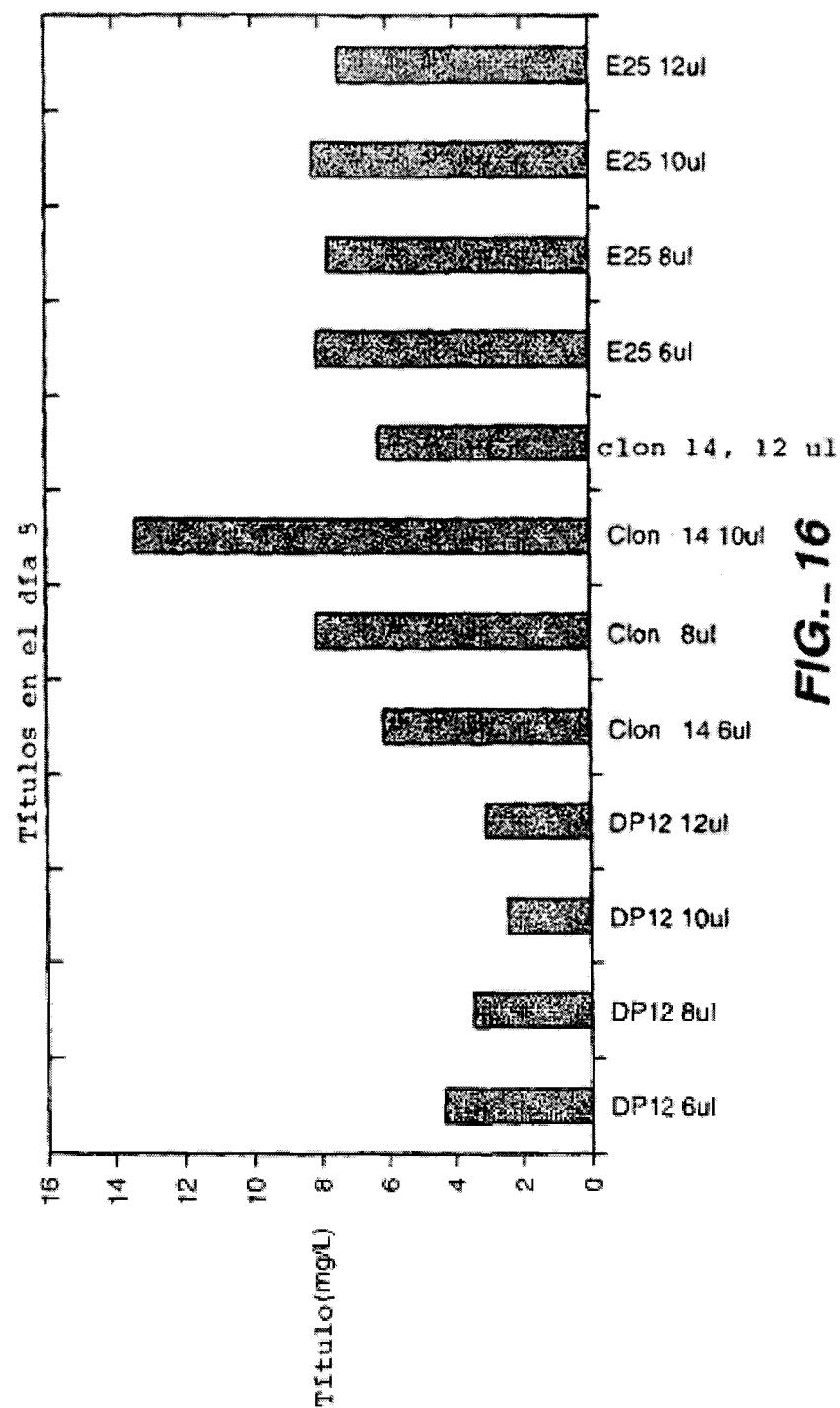


FIG.- 15



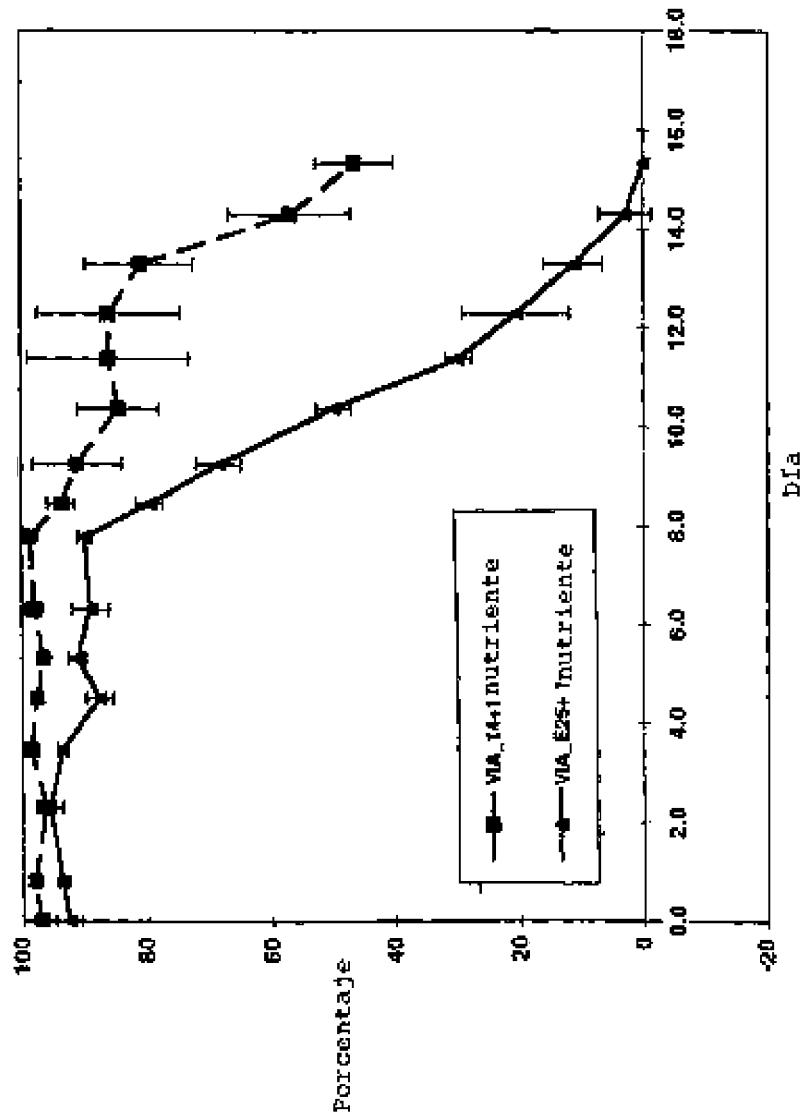


FIG. 17

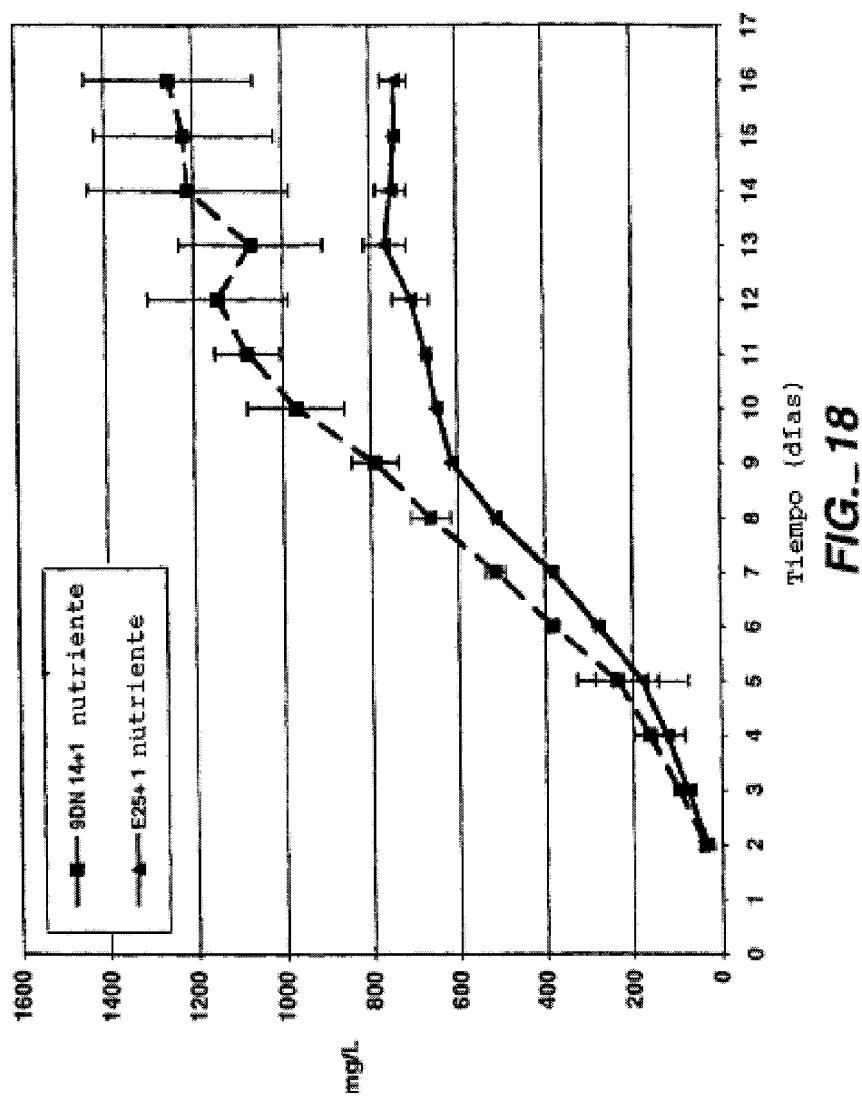
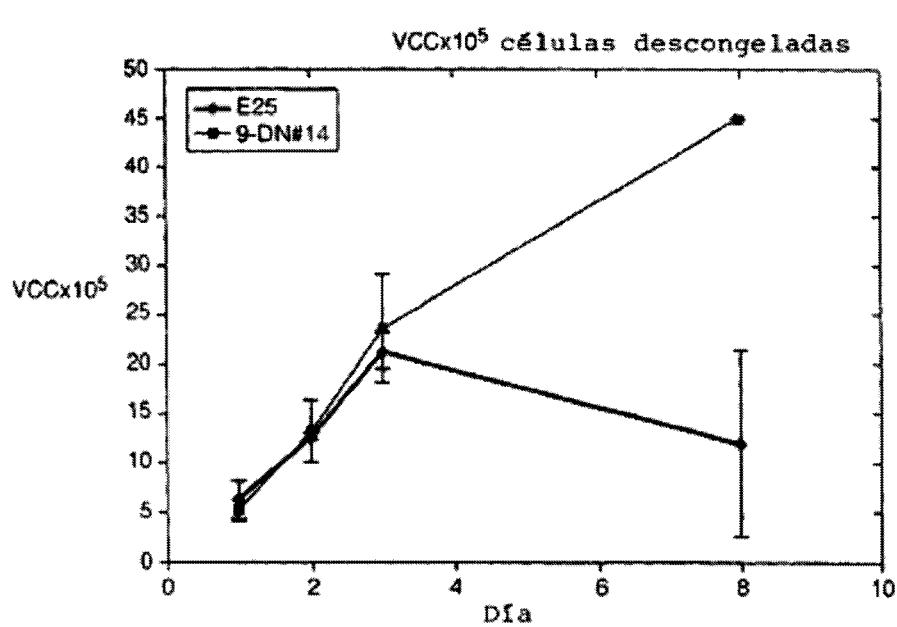
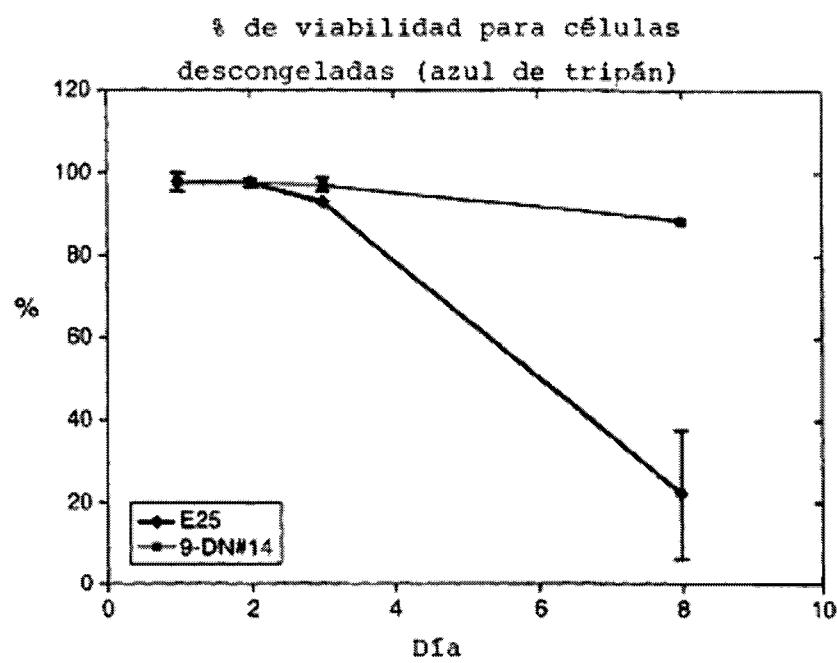


FIG. 18

ES 2 346 659 T3



ES 2 346 659 T3

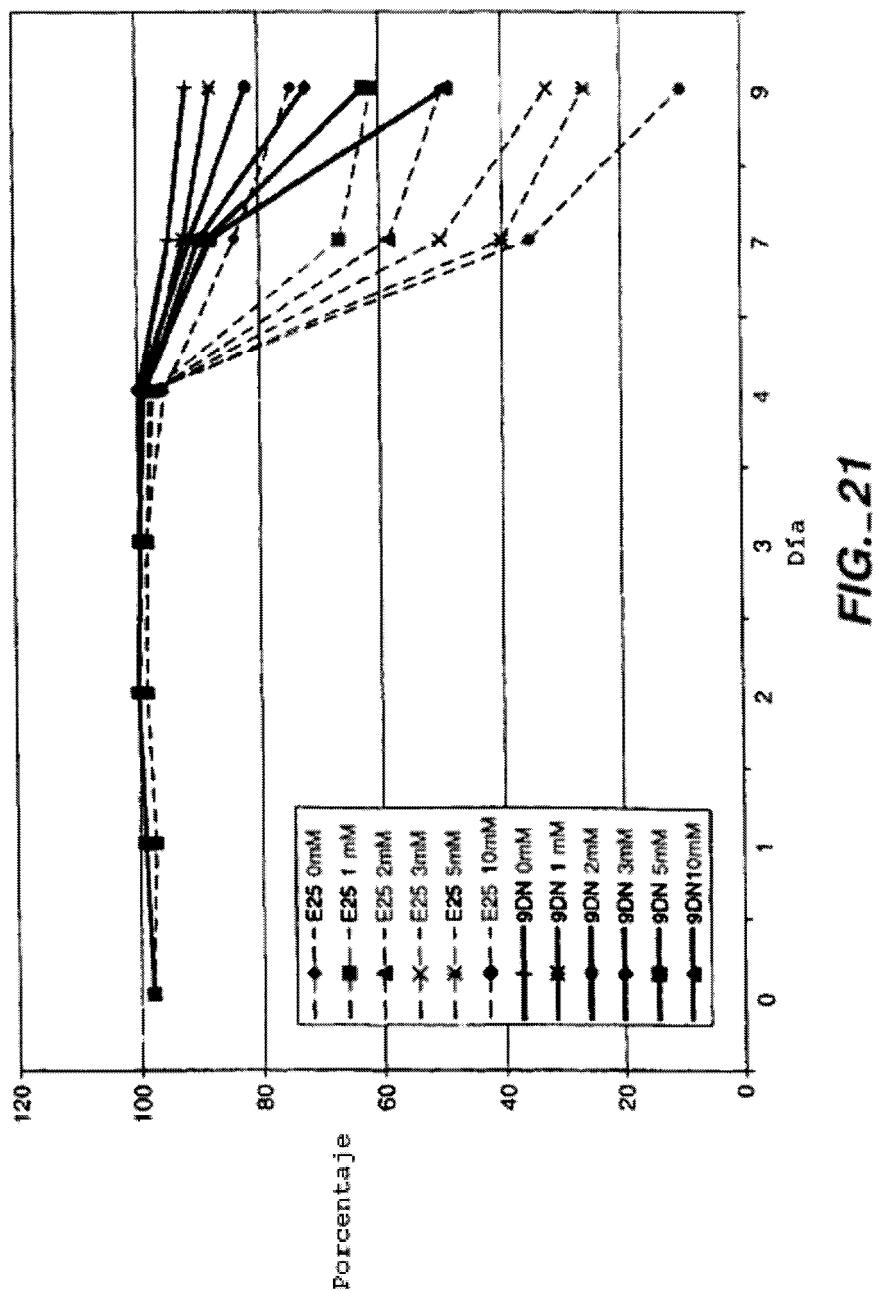


FIG. 21

ES 2 346 659 T3

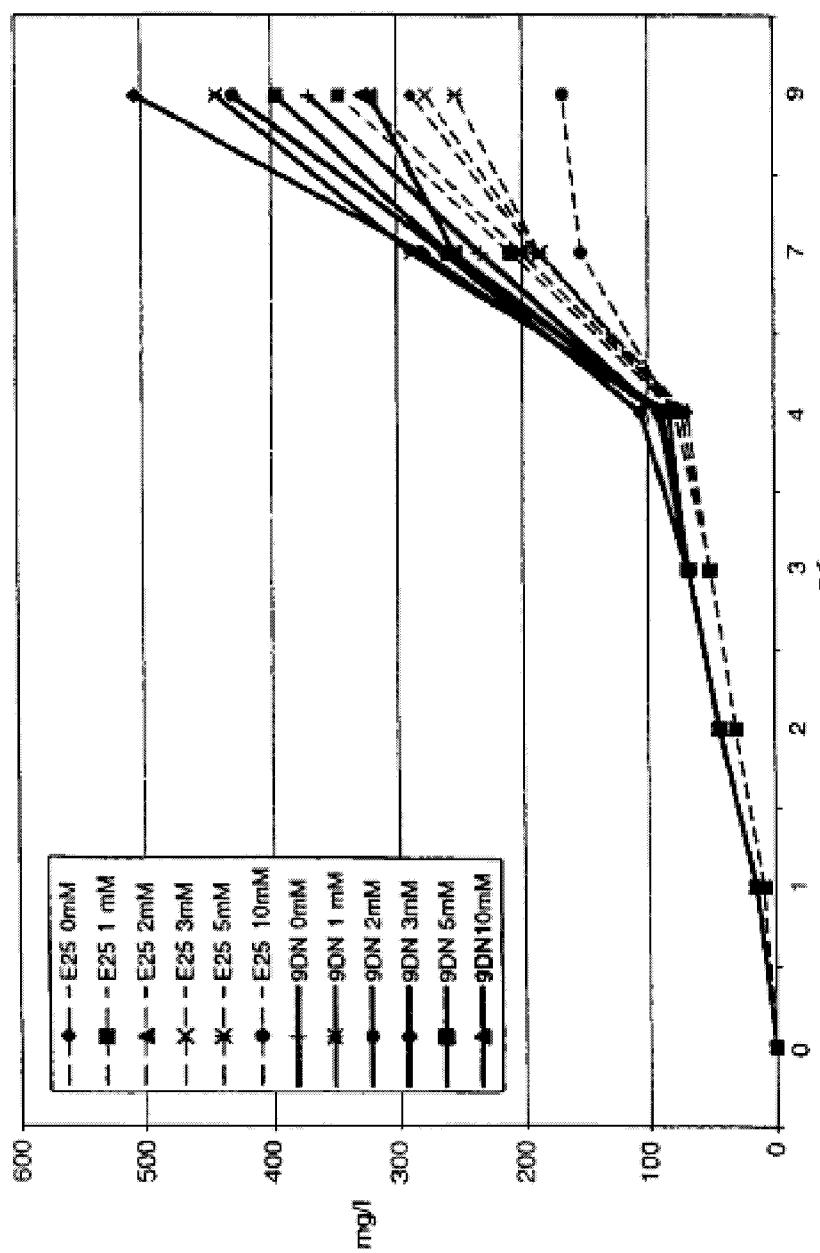


FIG. 22